

EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

ÜBER ZAHNSTEINHEMMENDE SUBSTANZEN

von

KARL WALTER ZILZ

1965

Aus der Konservierenden Abteilung (Leiter: Prof.Dr. J.Kluczka)
der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
(Direktor: Prof.Dr. F.Jung)
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

ÜBER ZAHNSTEINHEMMENDE SUBSTANZEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

KARL WALTER ZILZ

Zahnarzt aus Mannheim

MAINZ 1965



Dekan: Prof.Dr. K. Thomsen

Referent: Prof.Dr.Dr. P. Rieth

Korreferent: Prof.Dr. J. Kluczka

Tag der mündl.Prüfung: 2.Februar 1965

Gesamtherstellung:

DITTERS BÜRODIENST MAINZ



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. Zur Geschichte der Erforschung zahnsteinlösender und -verhindernder Substanzen	1
B. Untersuchungen über die Frühstadien des Zahnsteins	5
C. Eigene Untersuchungen	7
I. Experimentelle Versuche (in vitro)	7
1. Kurze enzym-chemische Übersicht	7
a) Der Einfluß des pH auf die Enzymaktivität	7
b) Der Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität	8
c) Die Stabilität der Lösung	8
d) Enzymkonzentration und Reaktionszeit	8
2. Substanzen	9
3. Methodik der Enzymaktivitätsbestimmung	10
Angewandte Analysenmethoden	10
4. Ergebnisse	12
5. Substratversuche mit enzymhaltigen Pasten	15
a) Methodik	15
b) Methodik der mathematisch-statistischen Sicherung	15
c) Ergebnisse	18
II. Klinische Versuche (in vivo)	26
1. Probanden	26
2. Substanzen	26
3. Methodik	26
4. Methodik der mathematisch-statistischen Sicherung ..	28
5. Ergebnisse	30
D. Diskussion	35
E. Zusammenfassung	37
F. Literaturangaben	38

A.) ZUR GESCHICHTE DER ERFORSCHUNG ZAHNSTEINLÖSENDE UND -VERHINDERNDER SUBSTANZEN

Wenn in der modernen Zahnheilkunde von Zahnstein gesprochen wird, so unterscheidet man grundsätzlich zwei Arten. Die Einteilung richtet sich entweder nach topographischen oder genetischen Gesichtspunkten: Topographisch ist der subgingivale vom supragingivalen Zahnstein zu unterscheiden. Genetisch ist der "bakteriologische oder enzymatische" vom "physiologisch-chemischen Niederschlag" zu unterscheiden, wie HODGE, H.C. und S.W. LEUNG (1950) feststellen. WANNEMACHER, E. und M. und J. HÖHLING (1962) kombinieren beide Differenzierungen dadurch, daß sie in supragingivalen Zahnstein und in Konkremente (= subgingival) einteilen. Struktur und Entstehung der Konkremente rechtfertigen diese Abtrennung.

In den alten Kulturen mit ihren ersten bekannten Anfängen einer Zahnheilkunde gab es schon die Bemühungen um die Entfernung des Zahnsteins. SCHROEDER, H.E. (1962) hat in einer Veröffentlichung die früheren Arbeiten zur Geschichte der Zahnsteinentfernung umfassend dargelegt.

Ausgangs des 19. Jahrhunderts, dem Zeitpunkt des eigentlichen Fortschrittes moderner Zahnheilkunde, wird von MILLER, W.D. (1896) et al. auf den Zusammenhang zwischen Zahnstein und der "Alveolarpyorrhoe" hingewiesen. Er empfiehlt zwar noch das regelmäßige Bürsten zur Verhinderung von Zahnsteinansatz, denkt aber auch schon an eine "chemische" Auflösung vorhandenen Zahnsteins. In den nun folgenden Jahrzehnten wird eine solche Menge von Möglichkeiten der Verhinderung von Zahnsteinbildung bekannt, daß es aus der Literatur allein fast unmöglich erscheint, sich ein Bild früherer Methoden zu machen, besonders aber von deren Wirksamkeit.

Rein klinischen Beobachtungen von SACHS, H. (1914) und ROSENTHAL, B. (1925) stehen die von KANTOROWICZ, A. (1924) und GOTTLIEB, B. und B. ORBAN (1933) gegenüber. Auch neueste Untersuchungen von SCHROEDER, E.H. und MÜHLEMAN, H.R. (1962) sind infolge mangelnder technischer und biochemischer Vorarbeiten noch nicht praxisreif, müssen aber als richtunggebend für die Zukunft betrachtet werden.

HERMANN, K. (1905) verwandte das Karlsbader Salz in der Paste "SOLVOLITH" und ROSENTHAL, B. (1919) Emser Salze im "EMSOLITH". Beide Autoren konnten eine günstige Wirkung auf die Lösung des Zahnsteins erkennen. WOLF, T. (1929) stellte bei Untersuchungen über die Wirksamkeit von "SOLVOLITH", "BIOX" und anderen Pasten fest, daß pulverisierter Zahn-

stein eine schwache Lösung und deutliche Erweichung der Beläge zeigt. TÜRK-HEIM, H. (1924) fand dagegen, daß alle Pasten mit Ausnahme der "LITHO- und TRAUNERPASTE" zu stark kalziumhaltig seien und so den größten Teil ihrer Energie zur Auflösung ihrer eigenen Kalziumsalze verwenden müßten, ausgesprochen saure Pasten (PEPSODENT) würden eine größere Kalksalzlösung verursachen. Da auf diesem Gebiet lange Zeit Ungewißheit herrschte, wurde immer wieder die Bürsten-Prophylaxe in den Vordergrund gestellt.

1924 brachte Dr. BRÄUNLICH die erste Zahnpaste mit Sulforizinoleat-Zusatz heraus, Pasten mit Sulfo- oder Natriumrizinoleat konnten sich bis heute halten ("BINACA"). WILLI, W. untersuchte 1930 die Wirksamkeit von Natriumsulforizinoleat (ein "mit Alkali neutralisiertes Sulfurierungsprodukt des Rizinusöles") bei 27 Patienten über 3-14 Monate. Er stellte fest: "Dieses Mittel hat ein großes Lösungsvermögen für wasserlösliche und auch für die meisten in Wasser unlöslichen Stoffe, eine außerordentliche Emulsionskraft und die Fähigkeit, unlösliche Substanzen (wie organische Verunreinigungen, Schleimstoffe, Schmutz, Epithelreste und dergleichen) zu emulgieren und zum Teil vielleicht auch kolloidal zu lösen, es hemmt Fäulnis, ist unwirksam gegen Kalziumkarbonat und für den Menschen absolut ungiftig." Auch OPPIKOFER, W. (1930) berichtet, daß Natrium-Rizinoleat (Natriumsalz der Rizinolsäure) klinisch weder giftig noch reizend wirkt, selektiv aber keimtötend ist und fähig, Bakterientoxine zu neutralisieren. Der Autor bestätigt auch die Auflösungskraft bei Wirkung auf Zahnbeläge (Verwendung als Wirkstoff der "SARIZOL"-Paste).

URBANTSCHITSCH, E. H. (1933) bestätigte die klinischen Untersuchungen von WILLI, W. (1930) und stellte dazu in In-vitro-Versuchen fest, daß das Natriumrizinoleat weder für Schmelz noch für Dentin im geringsten schädlich sei. SCHUPFER, K. (1934) kam bei "KALODONT" und BACK, R. (1938) bei "SOLIDOX" zu dem gleichen Ergebnis. Neue Versuche durch WILLI, W. (1937) bestätigten die früheren Resultate.

MATHIS, H. (1948), der bei der Therapie der "Parodontose" großes Gewicht auf die "Lokalbehandlung", und hier besonders auf die Entfernung des Zahnsteins, vor allem dessen "weicher Vorstufen", legt, stellte die Bürstenprophylaxe wieder in den Vordergrund. Er zweifelte an der Unschädlichkeit der oben genannten Pasten und hielt die Einwirkungsdauer für viel zu gering.

Neue Wege wurden durch amerikanische Autoren beschritten. KERR, D. A. und H. J. FIELD (1944) berichteten noch während des Krieges über das aus der Urologie bekannte Natrium-Hexamethaphosphat (hier verwendet zur intrarenalen

Auflösung von Nierensteinen des Phosphattyps). Es soll mit Kalzium lösliche Komplexe bilden. In In-vitro-Versuchen ist es unschädlich für Zahnhartsubstanzen, löst nach längerer Einwirkung subgingivalen und supragingivalen Zahnstein auf und verhindert auch die Zahnsteinablagerung, wenn es in Mundwässern oder Pasten verabreicht wird. KRAUS, F.W. (1958) bestätigte diese Tatsache, wies aber auch darauf hin, daß Silikatfüllungen aufgelöst werden. Nach KING, R.M. (1951) solle eine Plaque-Bildung durch in Paraffin gelöstes Tetradecylamin verhindert werden (Bildung eines absorbierenden Filmes auf der Zahnoberfläche, der lange genug haftet, um einen Plaque-Ansatz zu verhindern). STEWARD, B.G. (1952) gab die Schuld an der Zahnsteinbildung einem primären Mucin-Belag, der später Kalk absorbiert. Versuche mit Mucinase gaben ihm insofern recht, als sie positive Ergebnisse brachten. Seine Befunde wurden auch von ALEECE, A.A. und B.K.FORSCHER (1954) bestätigt. Diese fanden Mylase L 1 wirksam gegen farbige Beläge, während Prolase 100 und Papain geringer wirkten. GROSSMANN, L.J. (1954) testete EX 347 (Ex-tar) bei In-vitro-Versuchen. Er erhielt sehr unterschiedliche Ergebnisse. THOMAS, B.O.A. (1956) bezweifelte die Wirkung dieser Substanz, da eine wirkliche Hemmung nur an Stellen beobachtet wurde, die der Zahnbürste zugänglich waren. LEUNG, S.W. und F.J.DAUS (1959) experimentierten mit verschiedenen Enzymen und beobachteten eine deutliche Hemmung (bis zu 60%). JENSEN, A.L. (1959) stellte eine Reduzierung der Gingivitis um 70-90%, der Zahnsteinbildung um 60% nach Einwirkung von hydrolysiertem Pankreaspulver fest. Er verwandte dabei nicht einen Extrakt, sondern eine Mischung sämtlicher Pankreas-Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Lipase, Amylase, Carboxypeptidase, Elastase, Nucleasen und Esterasen).

MANDEL, I.D. (1958) und Mitarbeiter entwickelten eine Folienmethode und untersuchten damit 60 Std. alte künstlich verkalkte Plaques. Sie ließen Mylase L 1, Prolase 100, -Glukuronidase und Testikular-Hyaluronidase auf die Plaques einwirken. Nur der letztgenannte Stoff zeigte jedoch eine deutliche Wirkung. DOSSENBACH, W. und H.R.MÜHLEMANN (1961) bestätigten mit der gleichen Methode die Beobachtungen von OPPIKOFER, W. (1930) über Natrium-Rizinoleat, das die Zahnsteinbildung nahezu völlig hemmte. Penicillin dagegen zeigte keinerlei Wirkung. 1962 fand durch SCHROEDER, H.E. die gleiche Methode Anwendung bei der Untersuchung von 10 präsumptiven Zahnsteininhibitoren. Antibakteriell sowie als Invertseife wirkend, brachten neben einigen nicht näher beschriebenen Substanzen, Natrium-Rizinoleat, Cetylpyridiniumchlorid und ein Desinfektionsmittel die besten Ergebnisse. Von den Autoren wurden allerdings bei den verwendeten hohen Konzentratio-

nen der Inhibitoren den Versuchen keine große klinische Bedeutung beigemessen.

Bis zur Entwicklung der Folienmethode hatte man sich, um die Wirkung von Zahnsteininhibitoren in vivo zu testen, lediglich auf rein klinische Beobachtung und in einigen Fällen auf die Fixation der Mundverhältnisse mittels schematischer Zeichnungen (WILLI) oder Photographien (z.B.: STEWARD, ALEECE und FORSCHER) gestützt. Insofern bildeten die abnehmbaren Zahnsteinträger-Folien (parabelförmige, aufgerauhte Polyesterfolien, die mit Seidenfäden an den Lingualflächen der unteren Incisivi befestigt werden), einen großen Fortschritt.

Einwände gegen diese Methode können insofern erhoben werden, als: 1. die mechanische Putzwirkung durch die Zahnbürste nicht berücksichtigt wird, da die Folien bei der Mundpflege während des Versuches nicht mitgebürstet werden dürfen; 2. eine Applizierung von Wirkstoffen in Pastenform, wie sie dem normalen Zähneputzen entspricht, unmöglich ist (da sonst die Folien gelockert werden und verloren gehen). Gerade erstrebenswert wäre aber eine objektive Aussage, die sich auf die Wirkungen sowohl von Pastenzusätzen als auch der Bürste selbst erstreckt.

Bei der Verwendung von Pasten als Applikationsgrundlage muß also auf eine der älteren Methoden zurückgegriffen werden, eventuell in abgewandelter Form. Alle besprochenen Zahnsteininhibitoren stehen in engstem Zusammenhang mit der jeweils vorherrschenden Auffassung und Kenntnis über Zahnstein-genese und Ätiologie. Die meisten neuen Erkenntnisse wurden erst in den letzten zehn Jahren gemacht (LEUNG 1960; MANDEL 1960). Demzufolge richten sich die Bemühungen um die Zahnstein- (= Parodontose-) Prophylaxe mehr und mehr zugleich mit denen um die Kariesprophylaxe gegen die organische Matrix, d.h. gegen die frühesten plaque-ähnlichen Stadien des Zahnsteins.

Da die Wirkungen der unten mit Hilfe der Putz- und Spülmethode getesteten Zahnsteininhibitoren sich nur auf die supragingivale Flächen der Zähne beschränken, wurde im Rahmen dieser Arbeit der subgingivale Zahnstein nicht berücksichtigt. Wenn also im folgenden von Zahnstein die Rede ist, so wird ausschließlich der supragingivale Zahnstein angesprochen.

B.) UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FRÜHSTADIEN DES ZAHNSTEINS

Ein auf enzymatischer Wirkung beruhendes Präparat, das als Zahnsteininhibitor wirken soll, kann seinen Angriffspunkt nur in den Frühstadien finden. Untersuchungen über diese Frühstadien des Zahnsteins wurden in letzter Zeit vor allem in der Züricher Klinik durchgeführt. (In der Konservierenden Abteilung unserer Klinik laufen zur Zeit ebenfalls Untersuchungen auf diesem Gebiet.) Die folgenden Ausführungen lehnen sich hauptsächlich an eine Arbeit von SCHNEIDER, U. und H.R. MÜHLEMANN (1959) an. Äußerst schwierig erscheint im einzelnen eine chronologische Einteilung der Zahnsteinbildung, da erstens die Bildung von Belägen bei verschiedenen Probanden auch verschieden rasch vor sich geht, zweitens aber auch die Zusammensetzung von Proband zu Proband variiert. Dennoch findet man bei allen Einzelversuchen auffallende oder allgemeingültige Merkmale.

1 Tag alte Beläge

Vorwiegender Befund sind hier grampositive Mikroorganismen (Kokken und Stäbchen), abgelagert entweder als durchgehender Belag oder in Nestern. Der Durchmesser dieser Nester ist etwa 20-30 Mikroorganismen stark. In den Interdentalräumen werden die Kokkennester umfangreicher. Sobald eine gewisse Größe der Nester erreicht ist, lagert sich eine Grundsubstanz ein, was deutlich wird durch den Übergang der Gramfärbung von blauviolett zu rotviolett. Von einer gewissen Schnittdicke der Präparate ab lassen sich diverse Formen von Mikroorganismen feststellen: Monokokken, Diplokokken, Kokkenketten und -trauben, aber auch stäbchenförmige, gestreckte und gekrümmte Mikroben. Außerdem findet man auch einzelne Epithelzellen mit pyknotischem Kern. Mitunter sieht man auch einzelne weiße Blutkörperchen oder sogar ganze Nester, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad der Gingiva. Wo größere Kokkennester liegen, findet man keine Leukozytenansammlungen. Diese sind auch nicht mit Kokkenkolonien vergesellschaftet, sie liegen auf nackter Folie. Gramnegative Filamente findet man in so jungen Belägen nur vereinzelt. Sie haben ausgeprägte Köpfchen und sind solitär.

2 Tage alte Beläge

Hier findet man schon einen deutlich verdickten Mikroorganismenbelag von größerer oder geringerer Dichte. Er ist deutlich strukturiert. Zum Interdentalraum zu zeigt sich eine für ältere Beläge charakteristische Streifung. Mit der Färbung nach Papanicolaou treten abgegrenzte Stellen hervor, die im

Frühstadium keine Struktur zeigen. Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um nicht mehr vitale Mikroorganismen. Im Kalknachweis nach Kossa werden sie schwarz, auch andere Kalziumreaktionen werden positiv. Die Färbung nach Gram, sowie die Astralblau- und die Mucikarminfärbung werden immer geringer, schließlich werden nur noch die Ränder der Zentren damit angefärbt. Man kann daraus vermuten, daß die Mikroorganismen in den Zentren absterben und daß dort die bakteriellen oder die Speichelmucoide verändert werden. Schon in frühesten Stadien haben die Zentren eine deutliche Begrenzung, die immer ausgeprägter wird. Die Peripherie der Zentren macht den Eindruck einer Membran. Die Zentren treten nicht nur in den älteren Teilen der Beläge auf, oft findet man sie stark in jungen, peripheren Plaque-Abschnitten in einer Reihe, ein Zentrum neben dem anderen. Eine Verteilung über die ganze Breite des Belages ist aber auch möglich, viel öfter dagegen findet man sie in den verdickten Belägen der Interdentalräume.

3 Tage alte Beläge

Mit zunehmendem Alter findet man häufig, aber nicht immer, einen Pilzrasen. Nach SCHNEIDER, U. (1959) gleichen die Pilzfäden entweder einem "Ährenfeld im Wind", wobei alle Filamente auf die gleiche Seite geneigt sind, oder die Pilze bilden Kolonien, wie Kugeln, aus denen Fäden aussprossen.

Beläge älter als 3 Tage

Hier interessieren besonders die Zentren. Eine Färbung mit basischen Farbstoffen ist nicht möglich, dagegen aber mit sauren, oft ist eine deutliche Granulation festzustellen. Beim Kalzium-Nachweis imprägnieren sich die Zentren mit steigenden Expositionszeiten immer stärker mit Kaliumferrizyanid bzw. Silbernitrat. Eine Struktur ist durch die Stärke der Niederschläge nicht mehr zu erkennen.

Die Bildung der Zentren ist sicher nicht an Epithelzellen oder Leukozyten gebunden. Verantwortlich zu machen für die primäre Belagsbefestigung sind hauptsächlich die Mikroorganismen der Zahnsteinmatrix (Kokken und Filamente) (MANDEL, I.D.; LEVY, B.M.; WASSERMANN, B.H.; SCHNEIDER, U.; MÜHLEMANN, H.R.). Filamente bilden dabei nur einen fakultativen Bestandteil.

Eine Verkalkung ist auf folgende Arten möglich:

1. diffus granuläre Verkalkung,
2. Verkalkung in Form von Zentren, die aus Granula aufgebaut sind.

Die Verkalkungszentren scheinen devitalen Kokken- oder eventuell Filamentenkolonien zu entsprechen. Die membranartige Begrenzung gegenüber den Restbelägen und der Wechsel der Färbbarkeit (erst basisch, dann sauer) scheinen die Hypothese der lokalisierten Belagsnekrose zu rechtfertigen.

C.) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Experimentelle Versuche (in vitro)

Um einen Überblick über die Wirkung und Wirksamkeit der verwendeten biochemischen Präparate und der bei der Verwendung derselben einzuhaltenden Bedingungen, den auftretenden Schwierigkeiten und deren Vermeidung zu bekommen, sei ein allgemein gehaltener Abschnitt in Anlehnung an ähnliche Kapitel der biochemischen Fachliteratur vorausgeschickt (ABDERHALDEN, R. (1946); FLASCHENTRÄGER, B. (1951); LEHNARTZ, E. (1959)).

1. Kurze enzym-chemische Übersicht

Bei enzymatischen Reaktionen kommt es in noch höherem Maße als bei anderen chemischen Prozessen darauf an, die Reaktionsbedingungen unter strenger Kontrolle zu halten. Die Ursachen hierfür liegt in der labilen Natur der Enzyme, die nur innerhalb enger Temperatur- und pH-Intervalle aktiv sind.

Im folgenden werden alle Umstände angeführt, die es zu beachten gilt, wenn man die Verwendung von Enzymen möglichst wirkungsvoll und wirtschaftlich gestalten will.

a) Der Einfluß des pH auf die Enzymaktivität

Die Geschwindigkeit, mit welcher der enzymatische Abbau erfolgt, hängt weitgehend vom pH der Lösung ab. Das proteolytische Enzym Pepsin spaltet z.B. das Protein nur in einer sauren Lösung, während Trypsin seine Wirksamkeit in neutraler oder schwach alkalischer Lösung entfaltet.

Der größte Teil der heute bekannten Enzyme hat indessen seine maximale Aktivität - das pH-Optimum - in der Nähe des Neutralpunktes, und nur wenige haben, wie Pepsin, ihr Optimum in einer sauren Lösung.

Das pH-Optimum eines Enzyms ist jedoch nicht unter allen Umständen dasselbe, sondern hängt auch etwas von Temperatur und Reaktionszeit ab. Die Verschiebung, die infolge dieser Faktoren stattfindet, ist indessen in der

Regel so gering, daß man in der Praxis keine Rücksicht darauf zu nehmen braucht.

b) Der Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität

Wie bei allen chemischen Prozessen wächst die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion mit steigender Temperatur. Da Enzyme sehr temperaturempfindlich sind, wird damit zugleich die Zerstörung des Enzyms, seine Inaktivierung, beschleunigt, und die Temperatur, bei der die Aktivität maximal ist, die Optimumtemperatur, wird durch die vereinte Wirkung der beiden Faktoren, die Aktivitätssteigerung und die Inaktivierungsgeschwindigkeit, bestimmt. Oberhalb der Optimumtemperatur nimmt die Inaktivierung überhand, und das Enzym wird rasch zerstört.

Die Optimumtemperatur liegt gewöhnlich zwischen 30 und 40 Grad Celsius. Trypsin aus dem Pankreas hat z.B. sein Optimum bei 37 Grad Celsius.

c) Die Stabilität der Lösung

Wie bereits erwähnt, werden Enzyme in wässriger Lösung bei steigender Temperatur mit wachsender Geschwindigkeit inaktiviert; über den Einfluß des pH der Lösung lassen sich jedoch keine allgemeinen Angaben machen. Sicher ist, daß das pH-Optimum für Stabilität und Aktivität nur selten zusammenfällt.

In der Nähe des Aktivitätsoptimums wird eine wässrige Enzymlösung in den meisten Fällen eine bedeutende Stabilität besitzen, namentlich wenn ein Substrat vorhanden ist. Ebenso wie das Vorhandensein eines Substrates allgemein, können bei gewissen Enzymen anorganische Salze eine Stabilisierung bewirken. Als Beispiel für den letztgenannten Zusammenhang mag angeführt werden, daß sowohl kristallinisches Pankreas-Trypsin als auch kristalline Bakterien-Proteinasen durch Kalzium-Ionen stabilisiert werden. Eine Inaktivierung von Enzymen kann stattfinden, wenn in der Lösung stark reduzierende oder oxydierende Stoffe enthalten sind; ferner können Schwermetalle die Enzyme denaturieren und ausfällen.

d) Enzymkonzentration und Reaktionszeit

Ist im Verhältnis zur Enzymmenge ein Überschuß von Substrat vorhanden, dann ist die Menge des abgebauten Substrates proportional der Enzymkonzentration und der verwendeten Reaktionszeit. Mit fortschreitender Reaktion wird die Substratmenge durch die Spaltung reduziert, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit vermindert wird, bis zwischen Substrat, Enzym und Spaltungsprodukten

ein Gleichgewicht hergestellt ist. Gewöhnlich ist das Gleichgewicht zugunsten der Spaltungsprodukte stark verschoben, so daß man mit einem hinreichenden Überschuß an Enzym einen vollständigen Abbau des Substrates erzielen kann. Da es in der Regel wirtschaftliche und technische Gründe erfordern, eine möglichst kurze Reaktionszeit anzuwenden, so wird in den meisten Fällen die Enzymkonzentration zu variieren sein.

2. Substanzen

Bei den von uns getesteten Substanzen handelt es sich um Enzym-Präparate in Pulverform (keine kristallinen Enzyme), wie sie von der pharmazeutischen Industrie angeboten werden und sich für die Beimengung und damit Verwendung in Zahnpasten auf Phosphatbasis eignen.

Die Präparate zielen auf eine enzymatische Auflösung der organischen Grundsubstanz der Zahnsteinmatrix (Belagsbildung hauptsächlich durch Kohlehydrate und Eiweiße, eventuell in ganz geringem Maß durch Fette) ab, noch ehe Kalksalze ausgefällt werden. Nur in diesem Stadium ist ein Angriff mit Enzymen wirkungsvoll und damit sinnvoll.

Für die Verwendung in der Mundhöhle kommen den vorausgegangenen Erläuterungen nach nur solche Präparate in Frage, die Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette angreifen und in Temperatur- und pH-Optimum ungefähr den dort vorgefundenen Verhältnissen entsprechen, d.h. einer Temperatur von ungefähr 37 Grad Celsius und einem pH-Wert von ca. 7. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen kommen an körpereigenen Enzymen nur die des Pankreas oder diesen entsprechende in Frage, also:

a) Kohlenhydrat abbauende Enzyme:

Mylase 100
Diastase
Biolase
Amylase
und Bakterien-Amylase

b) Eiweiß abbauende Enzyme:

Trypsin
und Papain aus Pflanzen

c) als Fette spaltendes Enzym:

Lipase.

3. Methodik der Enzymaktivitätsbestimmung

Es wäre das Natürlichste, als Maß für die katalytische Wirkung eines Enzympräparates seinen Gehalt an kristallinisch reinem Enzym zu wählen, aber dieses Verfahren hat noch nicht Eingang gefunden, teils weil nicht alle technisch angewendeten Enzyme in vollständig reiner Form hergestellt werden, teils weil ein kristalliner Zustand nicht unbedingt gleichbedeutend ist mit absoluter Reinheit. Meist wird der Enzymgehalt in willkürlichen Aktivitätseinheiten angegeben, welche die katalytische Wirkung des Präparates einem näher definierten Substrat gegenüber ausdrücken.

Die Aktivitätsbestimmung wird in der Regel in der Weise ausgeführt, daß man das Enzym eine bestimmte Zeit lang und unter standardisierten Versuchsbedingungen (pH, Temperatur und Substratkonzentration) mit einem Substrat reagieren läßt und dann die Menge der Spaltungsprodukte mißt, die sich gebildet haben, oder die Menge des übriggebliebenen Substrates. Da die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Enzymkonzentration ist, muß die Menge des abgebauten Substrates ein Maß für den Enzymgehalt des Präparates sein. Die Reaktion läßt sich auch dadurch verfolgen, daß man Änderungen in den physikalischen Eigenschaften des Substrates mißt, z.B. seine Viskosität.

Wegen der großen Unterschiede, die bei den verschiedenen Methoden hinsichtlich Meßprinzip, Substrat und Substratkonzentration bestehen, ist es nur ungefähr möglich, allgemeine Umrechnungszahlen anzugeben, mit denen man die Aktivität eines Enzympräparates von einer Einheit in die andere umrechnen kann, was bei einem Vergleich erforderlich wäre. Die Umrechnungszahlen hängen davon ab, ob es sich um reine Enzyme oder um Mischungen von Enzymen handelt.

Angewandte Analysenmethoden:

In Anlehnung an BAMANN, E. und K. MYRBÄCK (1941) und ANDERSEN, B. (1943) wurden von uns folgende Analysenmethoden ausgeführt:

- a) Bestimmung der Amylaseaktivität nach WILLSTÄTTER
- b) Bestimmung der Papainaktivität nach WILLSTÄTTER
- c) Bestimmung der Lipaseaktivität nach WILLSTÄTTER
- d) Bestimmung der proteolytischen Aktivität nach ANDERSEN

zu a) Amylase-Testmethode nach WILLSTÄTTER, R. (1923)

Eine Lösung, die eine bestimmte Menge lösliche Stärke, einen Phosphatpuffer von pH 6,8 und Natriumchlorid enthält, wird mit einer gewissen Menge

(Milligramm) Amylase 10 Minuten lang bei 37 Grad C aufgespalten. Die Reaktion wird durch Zusatz von Salzsäure abgebrochen und die Menge von Aldehydgruppen, die sich gebildet hat, wird durch Hypojodit-Titrierung bestimmt. Die Differenz im Jodverbrauch zwischen dem Haupt- und dem Blindwert ist ein Ausdruck für den Amylasegehalt, der aus der entstandenen Maltose berechnet wird. (1 ccm 0,2 n Jod = 17,15 mg Maltoseanhydrit). Die Ergebnisse werden in die Formel für die Reaktionsgleichung eingesetzt. Die Willstätter-Amylase-Einheiten werden durch die Reaktionskonstante ausgedrückt, nach der Gleichung:

$$K = \frac{1}{t} \times \lg \frac{a}{a-x};$$

t = Reaktionszeit; a = Anfangskonzentration; x = die dem Jodverbrauch entsprechende Menge Maltose.

zu b) Papain-Testmethode nach WILLSTÄTTER (1924);
später abgewandelter Test für proteolytische Aktivität nach
WILLSTÄTTER (1926)

Eine Gelatinelösung mit festgelegter Konzentration wird von dem vorher aktivierten proteolytischen Enzym bei 37 Grad C und einem pH von 8,6 aufgespalten. Die Reaktionszeit beträgt 20 Minuten und die Reaktion wird durch Zusatz von absolutem Alkohol unterbrochen. Die durch die enzymatische Spaltung freigesetzten Karboxylgruppen werden mit alkoholischem Alkali und Tymolphthalein als Indikator titriert, zuerst bis zur Blaufärbung, dann nach Zusatz von kochendem Alkohol bis zur graublauen Farbtönung einer Vergleichslösung. Eine Blindbestimmung, bei der das Enzym vor der Reaktion mit Alkohol gefällt worden ist, wird in genau derselben Weise ausgeführt. Die Differenz im Alkoholverbrauch zwischen Haupt- und Blindwert ist ein Ausdruck für die proteolytische Aktivität, die in Willstätter-Papain-Einheiten aus einer angegebenen Kurve zu entnehmen sind.

zu c) Pankreas-Lipase-Testmethode n. WILLSTÄTTER (1923)

Eine bestimmte Menge in Äther gelöstes Olivenöl wird von dem fettspalten- den Enzym bei 30 Grad C und einem pH von 8,9 abgebaut. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von heißem Isopropylalkohol abgebrochen, die freigewordenen Karboxylgruppen werden auch hier mit alkoholischem Alkali und Tymolphthalein als Indikator titriert. Als Willstätter-Lipase-Einheit wird die Menge Lipase bezeichnet, die unter den angegebenen Bedingungen bei 30 Grad C in 1 Stunde 24% von 2,5 Gramm Olivenöl mit der Verseifungszahl 185,5 spaltet.

Z.B.: Bei einem Verbrauch von 70,6 mg KOH

$$\frac{70,6 \times 100}{185,5 \times 2,5} = 15,2\%$$

Auf einer angegebenen Kurve kann mit Hilfe dieser %-Zahl die Größe der Enzymaktivität und damit die Zahl der Einheiten abgelesen werden.

zu d) Testmethode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität nach ANDERSEN (1943) (abgewandelter Gross-Fuld-Test)

In einer Reagenzglasreihe wird in gleicher Menge eine 7,5%ige Gelatinelösung und eine 5%ige NaHCO_2 -Lösung eingefüllt. Dazu kommt eine Trypsinlösung in absteigender Konzentration; nach guter Durchmischung wird 10 Minuten bei 37°C bebrütet und anschließend einige Stunden im Kühlschrank abgekühlt. Das letzte Reagenzglas, dessen Inhalt flüssig bleibt, enthält $\frac{1}{2}$ Gross-Fuld-Einheit. Aus der Verdünnung in diesem Reagenzglas z.B. 1:64 und vorstehender Angabe läßt sich die Menge der Enzym-Einheiten der anfänglichen Enzymlösung berechnen. Mittels einer Umrechnungstabelle lassen sich die Gross-Fuld-Einheiten auf Willstätter-Trypsin-Einheiten umrechnen.

Abb.1 zeigt die Versuchsanordnung des WILLSTÄTTER-Amylase-Testes, hier als Beispiel für eine biochemische Enzym-Aktivitäts-Prüfung. Rechts der Thermostat, links die Stopp-Uhr, in der Mitte hinten die Büretten mit n/10 Jod-Lösung und n/10 Natriumdisulfit-Lösung, davor die Reagenzien und als Reaktionsgefäße 3 Erlenmeyer-Kolben mit Schliffstopfen, vorn verschiedene Pipetten.

Die Abbildungen 2 und 3 veranschaulichen den Enzym-Aktivitäts-Test nach ANDERSEN (zuerst durch GROSS-FULD entwickelt, später abgewandelt). Die Bilder zeigen den Zustand nach abgelaufener Reaktion und einigen Stunden Aufbewahrung bei 4 Grad C. Die Reagenzgläser enthalten in Abb.2 kein Enzym, in Abb.3 Trypsin in absteigender Konzentration von rechts unten nach links oben. Der Inhalt der Gläser 1-7 ist hier verflüssigt und auch nach Abkühlung flüssig geblieben. Glas Nr.7 enthält als letztes mit flüssigem Inhalt nach GROSS-FULD $\frac{1}{2}$ Trypsin-Einheit.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Enzymprüfungen wurden angegeben in WILLSTÄTTER-Einheiten pro Gramm Enzympräparat und nach Aktivität größenmäßig geordnet. Jeder Versuch wurde doppelt ausgeführt und die Ergebnisse gemittelt; die Differenzen waren äußerst gering.



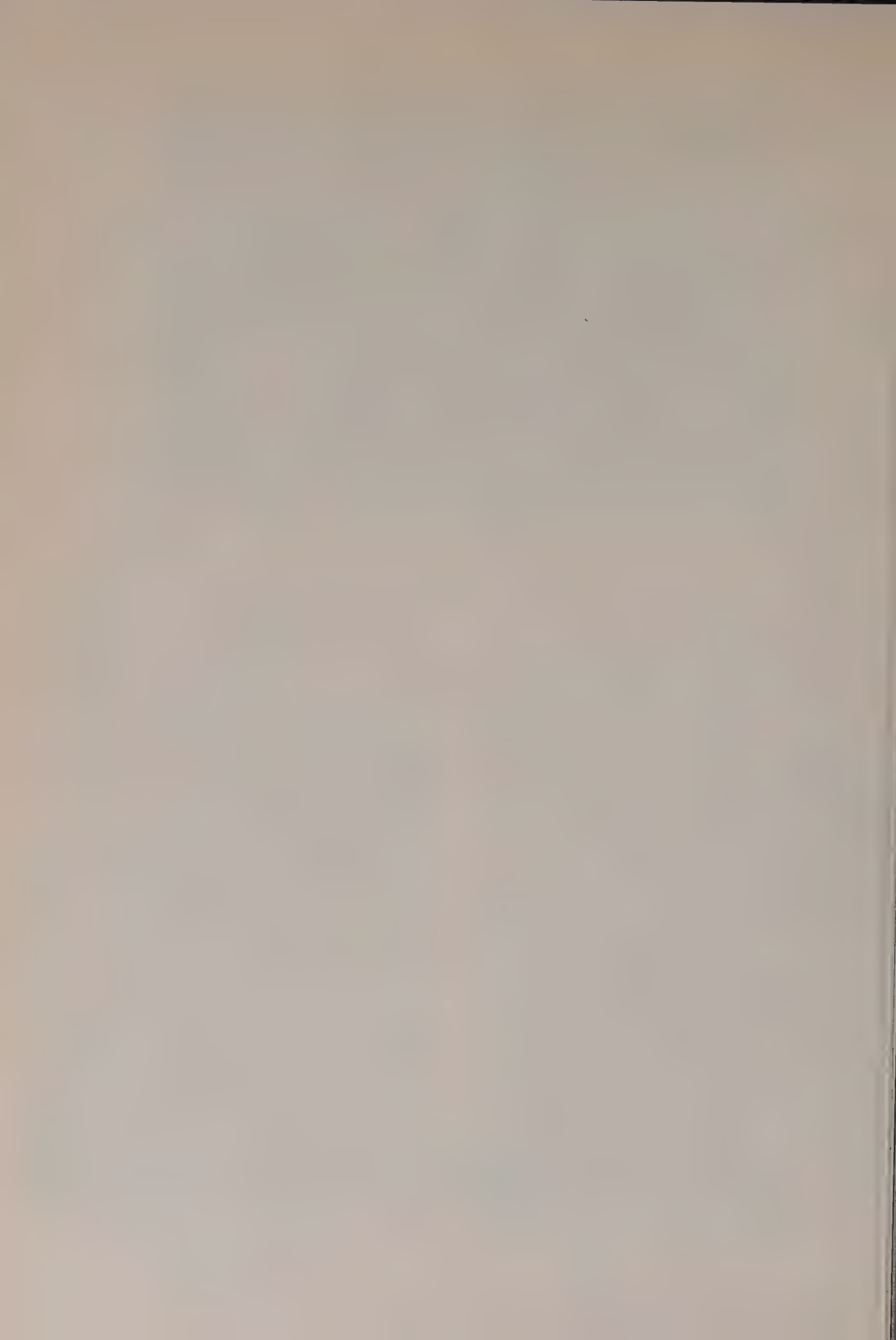
Abb. 1 : Versuchsanordnung des WILLSTÄTTER-Amylase-Testes



Abb. 2 : Test nach ANDERSEN
ohne Enzymeinwirkung



Abb. 3 : Der gleiche Test bei
Enzymeinwirkung



a) Kohlenhydrat abbauende Enzyme, getestet nach der Methode von WILLSTÄTTER

$$\begin{aligned} \text{Mylase 100:} \quad K &= \frac{1}{10} \times \lg \frac{0,1875}{0,1566} = 0,007821 \\ &= 78,2 \text{ Einheiten/g;} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Bakterien-Amylase:} \quad K &= \frac{1}{10} \times \lg \frac{0,1875}{0,1690} = 0,004511 \\ &= 45,11 \text{ Einheiten/g;} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Diastase:} \quad K &= \frac{1}{10} \times \lg \frac{0,1875}{0,1751} = 0,002971 \\ &= 29,71 \text{ Einheiten/g;} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Biolase:} \quad K &= \frac{1}{10} \times \lg \frac{0,1875}{0,172} = 0,002454 \\ &= 24,54 \text{ Einheiten/g;} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Amylase:} \quad K &= \frac{1}{10} \times \lg \frac{0,1875}{0,1841} = 0,000795 \\ &= 7,95 \text{ Einheiten/g} \end{aligned}$$

b) Eiweiß abbauende Enzyme getestet nach den Methoden von ANDERSEN (GROSS-FULD) und WILLSTÄTTER

Die Ergebnisse nach ANDERSEN wurden auf WILLSTÄTTER-Trypsin-Einheiten umgerechnet.

Trypsin:

Glas Nr. 7 blieb als letztes flüssig (Verdünnung 1: 64), also enthält es 1/2

Gross-Fuld-Einheit;

daraus folgt: In 10 mg Enzym sind 32 Einheiten;

1 g enthält 3200 Einheiten;

Auf Willstätter-Einheiten umgerechnet ergibt sich

1 g dieses untersuchten Trypsins enthält

256000 Willstätter-Trypsin-Einheiten.

(80 Willstätter-Einheiten = 1 Gross-Fuld-Einheit).

Papain:

Da die Differenz bei diesem Versuch 1,35 betrug, ergeben sich aus der von Willstätter angegebenen Kurve 26 Einheiten in 10 mg Präparat;

1 g enthält also 2600 Einheiten.

c) Fett spaltendes Enzym getestet nach WILLSTÄTTER

Lipase:

Die prozentuale Spaltung von 2,5 g Olivenöl mit der Verseifungszahl 185,5 betrug:

$$\frac{26,928 \times 100}{185,5 \times 2,5} = 5,8\%;$$

Nach der von Willstätter für diesen Versuch angegebenen Kurve enthalten also 10 mg dieser Lipase 0,09 Einheiten;

1 g enthält 9 Einheiten.

Nach diesen Ergebnissen wurden je ein kohlenhydrat- und ein eiweiß-spaltendes Enzym für die Verwendung in einer Testzahnpaste ausgewählt.

Infolge ihrer starken Konzentration mußte bei den Amylasen aus geschmacklichen und wirtschaftlichen Gründen die Mylase 100 ausgeschieden werden, da sie in einer Paste für den allgemeinen Gebrauch nicht verwendet werden kann. Diastase, Biolase und Amylase haben eine zu geringe Wirkungskonzentration, bei ihnen wäre in ausreichender Konzentration der unangenehme Geschmack, den alle Enzympräparate zeigen, nicht zu überdecken. Es blieb also in dieser Gruppe zu weiteren Versuchen nur die Bakterien-Amylase übrig. Sie hat eine ausreichende Wirkungskonzentration, einen nur schwach unangenehmen Geschmack und ist wirtschaftlich (d.h. preismäßig) verwendbar.

Bei den Eiweiß spaltenden Fermenten blieb nur das Trypsin, da es sich ähnlich wie die Bakterien-Amylase verhält. Da das Papain vor der Verwendung aktiviert werden muß, was in einer Zahnpaste nicht zu erreichen ist, mußte es ausgeschieden werden.

Neben den für die Amylase geltenden Gründen spielt auch noch eine Rolle, daß die Konzentration gegenüber dem Trypsin gering ist und daß Papain natives Eiweiß stark angreift (was bei Trypsin nicht der Fall ist).

Die Lipase als fettspaltendes Enzym wurde wegen geringer Wirksamkeit und äußerst schlechtem Geschmack ausgeschieden, auch spielt Fett bei der Belagsbildung nur eine sehr untergeordnete Rolle, so daß in einer Zahnpaste auf ein fettspaltendes Enzym verzichtet werden kann.

5. Substrat-Versuche mit enzymhaltigen Pasten

a) Methodik:

In den als Vorversuch durchgeführten Testreihen wurden je 2 g Paste (die bei normalem Zähneputzen verwendete Menge) auf 10% ige Stärke-Substratböden und auf 15% ige Gelatine-Böden ausgestrichen und bei 37 Grad C bebrütet. Beide, Kohlenhydrat- wie Eiweißböden waren auf pH 6,8 gepuffert. Die Pasten enthielten, außer der normalen Zusammensetzung auf Phosphat-Basis jeweils 1% der Enzyme. Nach 1, 5; 3; 6 und 12 Stunden wurden je 4 Platten entnommen und sofort auf 4 Grad C abgekühlt, d.h. die Enzymreaktion wurde praktisch abgebrochen. Noch kürzere Einwirkungszeiten wurden wegen zu großer Fehlermöglichkeiten verworfen.

Die Platten wurden gewogen (0,001 g Genauigkeit), danach die verflüssigten Substratteile und die Reste der Pasten abgespült, mit Luft scharf abgeblasen und wieder gewogen. Mit jeweils zwei Hauptversuchen lief ein Leer-Versuch (hierbei wurde eine Paste der gleichen Zusammensetzung, aber ohne Enzymzusatz, verwendet) mit, der in allen Fällen negativ verlief. Geringe Gewichtsverluste ergaben sich durch Verdunstung bei allen Versuchen, geringe Gewichtszunahmen bei den Gelatine-Leerversuchen durch das Absinken der ganzen, unveränderten Pastenschicht in die bei 37 Grad flüssige Gelatine und deren Einschluß darin beim Abkühlen. Beide zusätzlichen Gewichtsveränderungen wurden bei der Berechnung der Hauptwerte berücksichtigt, d.h. von jeder Masse wurde ein Leer- und ein Hauptversuch angesetzt und die im Leerver-such ermittelte Gewichts-differenz wurde von der Differenz des Hauptversuches abgezogen. Von den jeweiligen 4 Hauptwerten wurden Durchschnittswerte ermittelt.

b) Methodik der mathematisch-statistischen Sicherung

Bei den im folgenden beschriebenen In-vitro-Versuchen ergaben sich Werte pro Einheit sowohl bei Versuchsbeginn als auch nach dem Versuch. Aus diesen Wertepaaren wurden Differenzen gebildet (die Werte stellen die jeweilige, vorhandene g-Menge an Substrat dar; die Differenz zeigt die jeweilige durch die Enzyme hydrolysierte Substrat-Menge in g). Da die Ergebnisse nach der Einwirkung der Paste durchwegs niedriger waren als vor dem Versuch, konnten wir auf eine statistische Prüfung dieser Unterschiede innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen verzichten. Es kam vielmehr darauf an festzustellen, ob die Ergebnisse bei der einen Versuchsanordnung sich wesentlich unterschieden von denen bei der anderen.

Für den Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsanordnungen wählten wir die pro Anordnung erzielten Differenzen. Bei den In-vitro-Versuchen wurden für jede Anordnung 10 Platten verwendet. Die Platten jeder Versuchsanordnung und die an ihnen gewonnenen Differenzen sind also unabhängig von denen der anderen. Die Differenzen verschiedener Anordnungen bei diesen In-vitro-Versuchen wurden mit Hilfe des "Rang-Testes" nach WILCOXON (KOLLER, S. (1955)) für unverbundene Stichproben statistisch geprüft. Zunächst soll an einem Beispiel der Wilcoxon-Test dargestellt werden.

Vergleich der Differenzen von Platten, die z.B. mit Versuchspaste Nr.1 und Versuchspaste Nr.3 behandelt wurden:

Gruppe 1 (Paste 1: 1 % Trypsin)			Gruppe 2 (Paste 3: 0,5% Trypsin)		
Nr.	Diff. in g (1)	Rang (2)	Nr.	Diff. in g (1)	Rang (2)
1	10,25	10	1	6,79	1
2	10,91	12	2	6,95	2
3	12,69	13	3	7,16	3
4	15,02	14	4	7,18	4
5	15,30	15	5	7,39	5
6	15,78	16	6	7,82	6
7	16,27	17	7	7,84	7
8	16,32	18	8	8,30	8
9	18,17	19	9	8,59	9
10	18,61	20	10	10,30	11

Da die Paste 3 an anderen Platten als die Paste 1 erprobt wurde, handelt es sich, wie erwähnt, um unverbundene Stichproben.

Den Differenzen beider Gruppen werden Rang-Nummern (Spalte 2) zugeteilt, und zwar dergestalt, daß die kleinste Differenz die Nr.1, die zweitkleinste die Nr.2, die drittkleinste die Nr.3 usw. und die größte die letzte Nr. erhält; haben mehrere Differenzen den gleichen Wert, so wird an sie gleichmäßig der Mittelwert ihrer Anordnungszahl vergeben. Die Numerierung erfolgt ohne Rücksicht darauf, ob der Fall in der Gruppe 1 oder in der Gruppe 2 steht. Aus den Rangnummern der Gruppe mit kleinerer Fallzahl wird die Summe (S_1) gebildet. Diese erhält den Index 1. Bei gleicher Fallzahl, wie in diesem Beispiel, kann eine beliebige Gruppe gewählt werden. Das Wesen der weiteren statistischen Prüfung kann man sich folgendermaßen veranschaulichen: wenn

man aus einer Reihe von 20 Rangnummern (10 in der Reihe 1, 10 Rangnummern der Reihe 2) sehr oft 10 Rangnummern entnehmen und die Summe der zufällig entnommenen Nummern bilden würde, dann würden, kombinatorisch bedingt, bestimmte Rangsummen oft, andere selten, wieder andere sehr selten auftreten. Man prüft, ob die vorliegende Rangsumme der Gruppe 1 zu den selten auftretenden Summen gehört. Wenn dies der Fall ist, wird die Hypothese zufälliger Entnahme (0-Hypothese) abgelehnt. Als "selten" bezeichnen wir hier das Auftreten in höchstens 1% einer großen Zahl von Versuchen. 1% ist damit die sogenannte Irrtumswahrscheinlichkeit (P), d.h. in höchstens 1% verwerfen wir die Zufallshypothese, obwohl sie zutrifft.

Wenn z.B. viele Differenzen in der Gruppe 1 im Vergleich zu denen der Gruppe 2 klein sind, erhalten sie kleine Rangnummern; die Rangsumme S_1 wird dann klein ausfallen. Weicht die Rangsumme so stark von der Erwartung (Durchschnittswert der Rangsumme bei zufälliger Entnahme) ab, daß eine Abweichung gleicher Größe nach unten oder oben zufällig nur in 1% vorkommt, wird die Zufallshypothese abgelehnt.

Im einzelnen gingen wir so vor:

Der nach der Zufallshypothese zu erwartende Wert für die Nummernsumme der 1. Gruppe lautet:

$$E_{S_1} = \frac{1}{2} n_1 (n_1 + n_2 + 1)$$

n_1 = Zahl der Fälle in der Gruppe 1;

n_2 = Zahl der Fälle in der Gruppe 2;

Die Differenz $|S_1 - E_{S_1}|$ wird mit Hilfe einer Tabelle des Wilcoxon-Testes (PFANZAGL, J. (1962)) auf Signifikanz geprüft.

Im Beispiel errechneten wir einen Erwartungswert

$$E_{S_1} = 5 (10 + 10 + 1) = 105;$$

und eine Rangsumme $S_1 = 154;$

Die Differenz $S_1 - E_{S_1}$ beträgt 49;

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% und bei einer Größe der Gruppen von $n_1 = 10$ und $n_2 = 10$ kann man laut Tabelle rein zufallsmäßig eine Differenz von höchstens 34,0 erwarten. Da die vorliegende Differenz größer als dieser Wert ist, darf der Unterschied als signifikant betrachtet werden.

c) Ergebnisse:

Die im folgenden niedergelegten Ergebnisse der Vorversuche wurden in der nebenstehenden Abbildung als Einzelpunkte graphisch dargestellt. Die errechneten Durchschnittswerte dann zusätzlich in das Koordinatensystem mit der Zeit als Abszisse und der g-Menge des umgesetzten Substrates als Ordinate eingezeichnet und durch Kurvenzug verbunden.

Test mit 2 g Paste, die 1% Bakterien-Amylase enthält (= 20 mg Enzym). Die Ergebnisse wurden nach Größe geordnet.

20 mg Bakterien-Amylase bauen ab:

In 1,5 Std.:	0,732 g	10%ige Stärke;
	0,895 g	" "
	0,914 g	" "
	<u>0,971 g</u>	" "
	3,512 g	

Der Durchschnittswert beträgt 0,878 g;

In 3 Std.:	1,285 g	10%ige Stärke;
	1,421 g	" "
	1,681 g	" "
	<u>1,693 g</u>	" "
	6,080	

Der Durchschnittswert beträgt 1,520 g;

In 6 Std.:	2,043 g	10%ige Stärke;
	2,102 g	" "
	2,419 g	" "
	<u>2,684 g</u>	" "
	9,248	

Der Durchschnittswert beträgt 2,312 g;

In 12 Std.:	3,063 g	10%ige Stärke;
	3,475 g	" "
	3,673 g	" "
	<u>3,925 g</u>	" "
	14,136	

Der Durchschnittswert beträgt 3,534 g;

Test mit 2 g Paste, die 1% Trypsin enthält (= 20 mg Enzym). Ergebnisse nach Größe geordnet.

20 mg Trypsin bauen ab:

In 1,5 Std.:	1,951 g	15%ige Gelatine;
	2,083 g	" "
	2,316 g	" "
	<u>2,546 g</u>	" "
	8,896	

Der Durchschnittswert beträgt 2,224 g;

In 3 Std.:	3,643 g	15%ige Gelatine;
	3,852 g	" "
	4,245 g	" "
	<u>4,348 g</u>	" "
	16,088	

Der Durchschnittswert beträgt 4,022 g;

In 6 Std.:	6,649 g	15%ige Gelatine;
	6,924 g	" "
	7,412 g	" "
	<u>7,635 g</u>	" "
	28,620	

Der Durchschnittswert beträgt 7,155 g;

In 12 Std.:	10,994 g	15%ige Gelatine;
	11,358 g	" "
	11,832 g	" "
	<u>12,183 g</u>	" "
	46,364	

Der Durchschnittswert beträgt 11,591 g.

Aus den Ergebnissen dieses Vorversuches und seiner graphischen Darstellung neben Seite 18 ist ersichtlich, daß bei Extrapolation des Kurvenzuges zum 0-Punkt der relative Anstieg nach 3 Minuten größer ist als zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. beide Kurven sind im Anfangsteil steiler als in ihrem späteren Verlauf. Daher kann bei nur 3 Min. Einwirkungszeit relativ mit etwas höherer

Wirkung gerechnet werden. Da es auf den genauen 3 Minuten-Wert nicht ankam, wurde nur linear interpoliert. Auf eine Berechnung nichtlinearer Regressionsgleichungen wurde verzichtet.

Die lineare Interpolation vom 1,5 Std.-Wert auf 3 Min. ergibt für die Amylase 29,29 mg Stärkeabbau und für das Trypsin 74,13 mg Gelatineabbau.

Die späteren statistischen Signifikanz-Prüfungen werden jedoch nicht mit den auf 3 Min. umgerechneten Ergebnissen, sondern mit den tatsächlichen Meßwerten bei 1,5 Std. durchgeführt. Die Umrechnungen auf 3 Min. erfolgte hier nur, um einen Anhalt zu haben, wie groß die Enzymeinwirkung nach einer so kleinen Zeitspanne, wie sie etwa den tatsächlichen Putzakten pro Tag entspricht, sein kann. Eine direkte Ermittlung der Wirkung nach 3 Min. ist aus technischen Gründen nicht möglich. (Die Fehlermöglichkeiten durch Wägen-
genauigkeit, bei der Verteilung der Pasten auf den Platten und Zeitfehler beim Erhitzen und Abkühlen sind erst beim 1,5 Std.-Wert so gering, daß sie sich nicht auswirken.)

Nach diesen vorbereitenden Versuchen wurden die prozentualen Verhältnisse des Enzymgehaltes der Pasten variiert und ausgetestet.

Paste Nr. 1

(1% Bakterien-Amylase; 1% Trypsin;
gepuffert auf pH 6,8; Einwirkungsdauer 1,5 Std.)

Paste Nr. 2

(0,5% Bakterien-Amylase; 0,5% Trypsin;
Zeit und Pufferung wie oben)

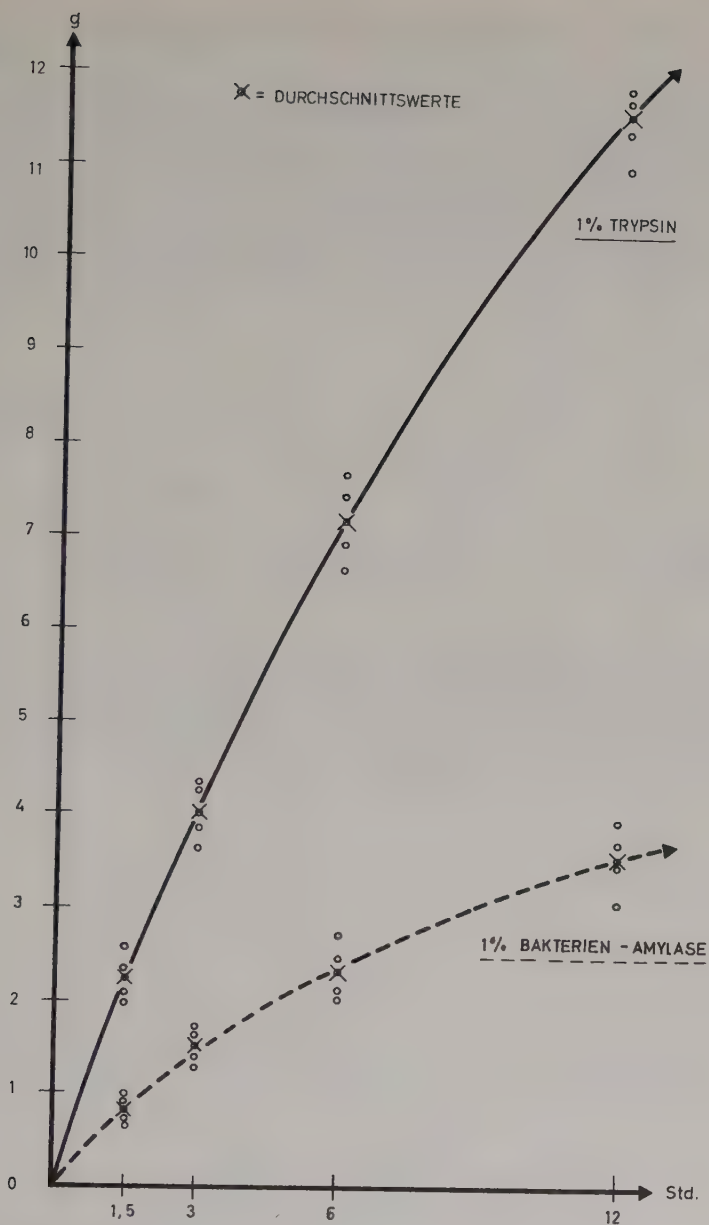
Paste Nr. 3

(1% Bakterien-Amylase; 0,5% Trypsin;
Zeit und Pufferung wie oben)

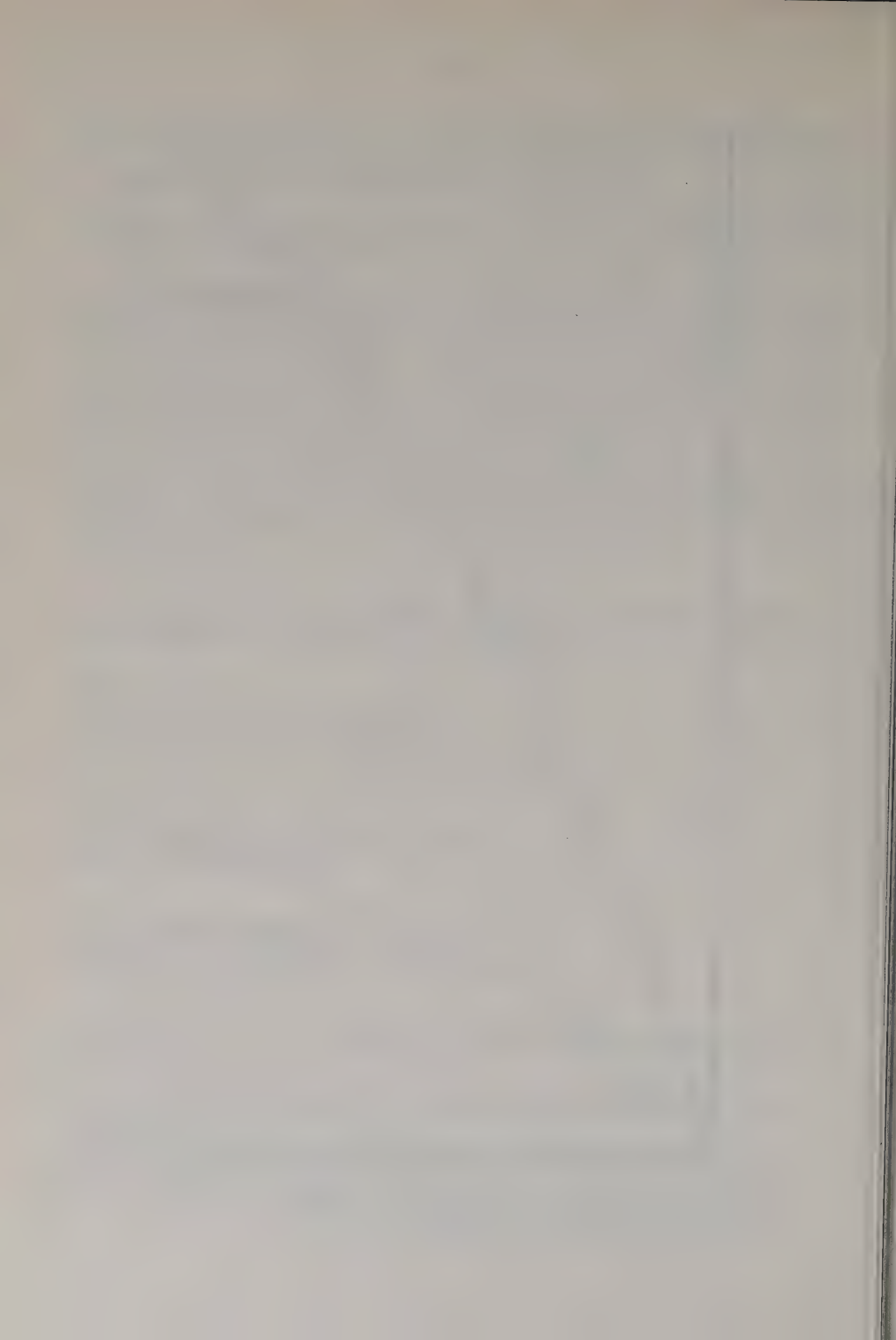
Die Stärke-Substratböden enthielten 10% Stärke, die Gelatine-Böden 15% Gelatine.

Wie bei den Vor-Versuchen auf S.15 wurden auch hier Kontroll-Versuche durchgeführt.

(Parallel-Versuche mit Pasten gleicher Art ohne Enzymgehalt bei jedem Haupt-Versuch). (Vgl. KUSCHINSKY, G. (1963)). Dabei entstanden nur ge-



Darstellung der Ergebnisse der Vorversuche (vgl. S. 27-29)
(g = g - Menge des umgesetzten Substrates).



ringe Gewichtsänderungen durch Kondenswasserbildung beim raschen Abkühlen.

Die Differenzen zwischen den Gewichten bei Versuchsbeginn und Versuchsabschluß von je 10 Hauptversuchen (jeweils 10 für Kohlenhydratabbau und 10 für Eiweißabbau) wurden unter Berücksichtigung der geringen Gewichtsänderungen (siehe S.16) bei den jeweiligen 10 Kontroll-Versuchen für jeden einzelnen Fall festgehalten und davon Durchschnittswerte errechnet ($\bar{x}$), außerdem die jeweilige Streuungsabweichung der Durchschnittswerte ($s_{\bar{x}}$), und zwar nach den Formeln:

$$\sum_{i=1}^n x_i = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n; \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}}{n - 1}; \quad s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{s^2}{n}};$$

Durchschnittswerte und Standardabweichungen der Mittelwerte wurden auf Grund des Kohlenhydratgehaltes (10%) und des Eiweißgehaltes (15%) auf den Stärke- bzw. Gelatineumsatz ($\bar{y}$ bzw. $s_{\bar{y}}$) umgerechnet. Schließlich erfolgte auch noch die Umrechnung auf den Umsatz in 3 Min. ($\bar{z}$ und $s_{\bar{z}}$).

Ergebnisse:

Tabelle 1

Differenzen zwischen den Gewichten vor und nach den Versuchen bei den Stärkeplatten (in g):

Platten-Nr.	Paste 1		Paste 2		Paste 3	
	Amylase 1%	Trypsin 1%	Amylase 0,5%	Trypsin 0,5%	Amylase 1 %	Trypsin 0,5 %
1	11,447		8,504		9,678	
2	11,794		7,265		10,314	
3	10,675		9,537		11,086	
4	12,923		8,123		10,839	
5	16,115		11,514		10,512	
6	15,567		11,002		11,479	
7	13,983		10,304		11,422	
8	12,291		9,726		10,628	
9	13,364		8,791		11,941	
10	11,132		7,388		12,454	
Summe	129,291		92,154		110,353	
$\bar{x}$	12,929		9,215		11,035	
$s_{\bar{x}}$	0,583		0,460		0,258	
$\bar{y}$	1,293		0,922		1,104	
$s_{\bar{y}}$	0,058		0,046		0,026	
$\bar{z}$	0,043		0,031		0,037	
$s_{\bar{z}}$	0,002		0,002		0,001	

Die verschiedenen Ergebnisse für Stärkeabbau bei gleicher %-Zahl der Enzyme mit Paste 1 und 3 kommen eventuell dadurch zustande, daß laut Angabe der Herstellerfirma das Trypsin-Präparat selbst noch etwas kohlehydratspaltendes Enzym enthält. Bei der Amylase ist ein umgekehrtes Verhalten nicht festzustellen.

Tabelle 2

Differenzen zwischen den Gewichten vor und nach den Versuchen bei den Gelatineplatten (in g):

Platten-Nr.	Paste 1	Paste 2	Paste 3
	Amylase 1% Trypsin 1%	Amylase 0,5% Trypsin 0,5%	Amylase 1% Trypsin 0,5%
1	18,167	10,917	7,164
2	15,304	8,081	7,386
3	18,613	7,226	8,303
4	16,268	9,450	8,593
5	10,245	9,743	7,179
6	16,318	8,812	6,946
7	10,909	7,754	7,821
8	15,024	8,649	6,788
9	12,691	7,114	7,837
10	15,783	10,138	10,304
Summe	149,322	87,884	78,321
$\bar{x}$	14,932	8,788	7,832
$s_{\bar{x}}$	0,893	0,402	0,330
$\bar{y}$	2,240	1,318	1,175
$s_{\bar{y}}$	0,134	0,060	0,050
$\bar{z}$	0,075	0,044	0,039
$s_{\bar{z}}$	0,004	0,002	0,002

Da nun geprüft werden soll, ob Konzentrationsunterschiede eines Fermentes bei konstantem Gehalt des anderen wirkungsmäßig nachgewiesen werden können, prüfen wir in bezug auf die Amylase die Pasten 2 und 3 (0,5 bzw. 1% Amylase bei gleichem Trypsingehalt von 0,5%) und in bezug auf das Trypsin Paste 1 und 3 (1% bzw. 0,5% Trypsin bei gleichem Amylasegehalt von 1%).

Tabelle 3

Vergleich der Ergebnisse mit Paste 1 und Paste 3 in bezug auf den Trypsin-gehalt:

Paste 1: 1% Trypsin			Paste 3: 0,5% Trypsin		
Nr.	Diff. in g	Rang	Nr.	Diff. in g	Rang
1	10,245	10	1	6,788	1
2	10,909	12	2	6,946	2
3	12,691	13	3	7,164	3
4	15,024	14	4	7,179	4
5	15,304	15	5	7,386	5
6	15,783	16	6	7,821	6
7	16,268	17	7	7,837	7
8	16,318	18	8	8,303	8
9	18,167	19	9	8,593	9
10	18,613	20	10	10,304	11

$$S_1 = 154; \quad E_{S_1} = 5(10 + 10 + 1) = 105;$$

$$S_1 - E_{S_1} = 49;$$

Da die vorliegende Differenz von 49 größer ist als der tabellierte Wert 34,0, darf der Unterschied als signifikant betrachtet werden ($P \leq 1\%$).

Tabelle 4

Vergleich der Ergebnisse mit Paste 2 und 3 in bezug auf den Amylasegehalt:

Paste 2: 0,5% Amylase			Paste 3: 1% Amylase		
Nr.	Diff. in g	Rang	Nr.	Diff. in g	Rang
1	7,265	1	1	9,678	7
2	7,388	2	2	10,314	10
3	8,123	3	3	10,512	11
4	8,504	4	4	10,628	12
5	8,791	5	5	10,839	13
6	9,537	6	6	11,086	15
7	9,726	8	7	11,422	16
8	10,304	9	8	11,479	17
9	11,002	14	9	11,941	19
10	11,514	18	10	12,454	20

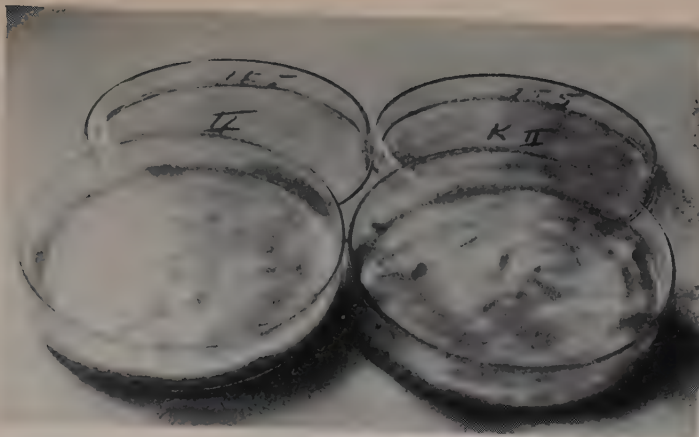


Abb. 4

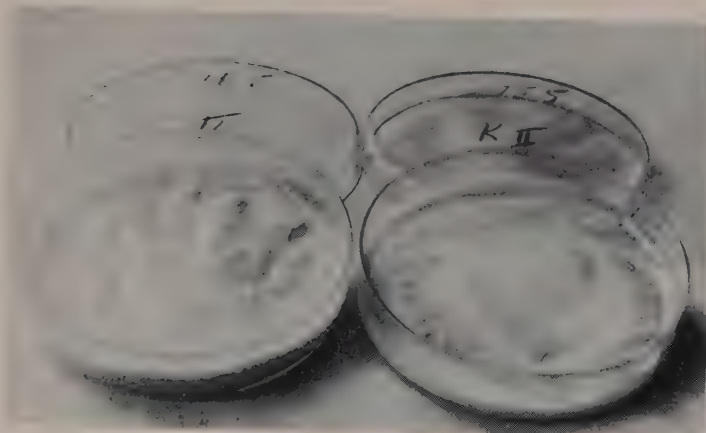


Abb. 5

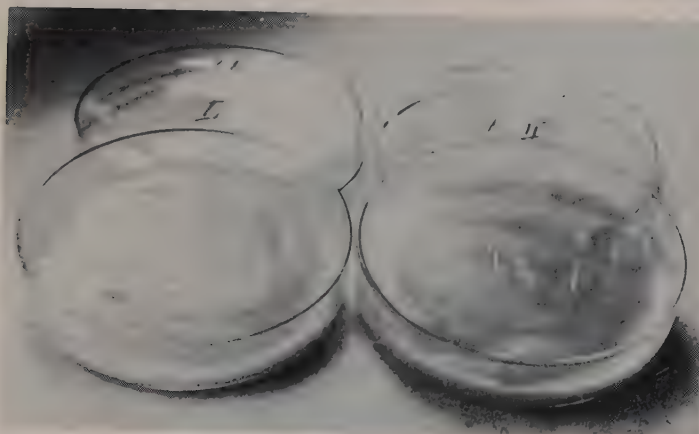


Abb. 6

Abb. 4 - 6 : Ablauf der Versuche mit Substratplatten (Stärkeböden,
links = Hauptversuch, rechts = Kontrollversuch)

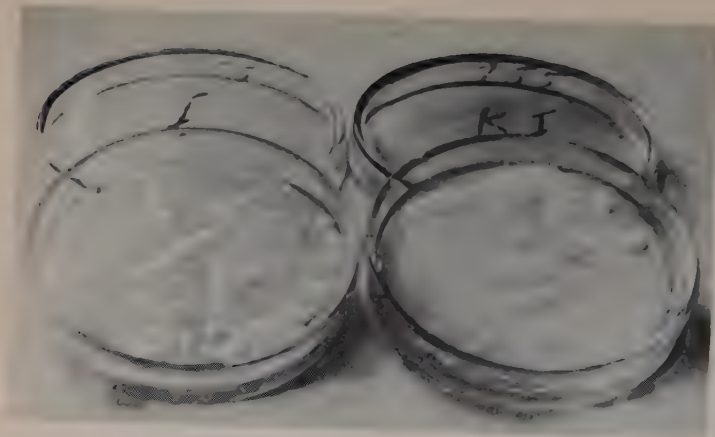


Abb. 7



Abb. 8

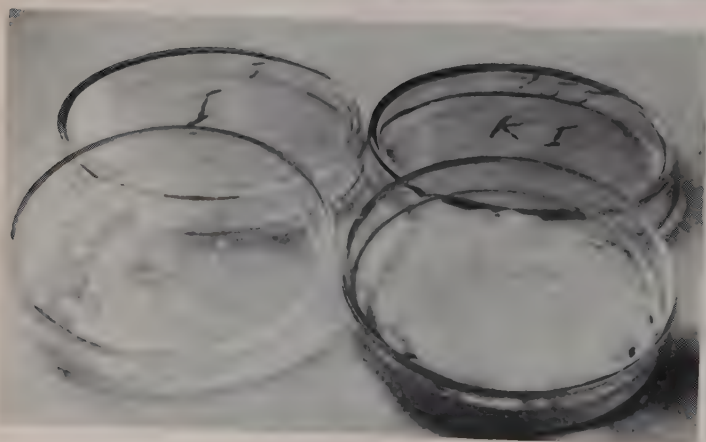


Abb. 9

Abb. 7 - 9: Versuche mit Substratplatten (Gelatineböden,
links = Hauptversuch, rechts = Kontrollversuch)

$$S_1 = 70;$$

$$E_{S_1} = 5 (10 + 10 + 1) = 105;$$

$$S_1 - E_{S_1} = -35;$$

Das negative Vorzeichen hat keinerlei Bedeutung in Beziehung auf das Ergebnis, da nur der absolute Wert zählt. Da auch diese Differenz größer ist als 34,0, darf auch hier der Unterschied als signifikant betrachtet werden ($P \leq 1\%$).

Die Abb. 4-6 und die Abb. 7-9 zeigen den Ablauf der Versuche mit Substratplatten, und zwar Abb.4-6 auf Stärkeböden, Abb.7-9 auf Gelatineböden; jede Abb. zeigt links den Hauptversuch, rechts den Kontrollversuch.

Die oberen Abbildungen, 4 und 7, zeigen jeweils den Zustand bei Beginn des Testes: die Pasten sind aufgestrichen.

Die mittleren Abbildungen, 5 und 8, zeigen den Zustand nach Bebrütung über 1,5 Std. und Abkühlung auf 4 Grad C; die bleibende Verflüssigung der oberen Substratschichten bei den Hauptversuchen ist erkennbar.

Die unteren Abbildungen, 6 und 9, zeigen den Zustand nach dem Entfernen der verflüssigten Substrat-Teile durch Abspülen und Abblasen. Auf den Kontrollversuchen ist keine Veränderung eingetreten.

Ein Unterschied bei diesen letzteren besteht insofern, als sich die Paste beim Kontrollversuch auf Abb.6 wieder voll entfernen ließ, während sie beim Placebo-Versuch auf Abb.8 und 9 vollkommen als ganze Schicht in die verflüssigte Gelatine abgesunken ist, dort beim Erkalten eingeschlossen wurde und gewichtsmäßig mitberechnet werden mußte (siehe S.15).

II. Klinische Versuche (in vivo)

1. Probanden

Als Probanden stellten sich dankenswerterweise männliche und weibliche Studierende der Zahnheilkunde zur Verfügung. Ihr Alter lag zwischen 22 und 38 Jahren, und sie mußten eine vollständige Zahnreihe wenigstens bis zum 2. Molaren aufweisen. Die Probanden wurden angewiesen, ihre Zahnpflege während der Versuchsperioden auf ein einmaliges morgendliches Zähneputzen zu beschränken; einer der Probanden mußte wegen mangelhafter Mundpflege und falschen Gebrauchs der Bürste ausgeschieden werden. Es wurden Putzversuche ohne Paste, eine Placeboversuchsperiode mit normaler Paste und Hauptversuche mit der Enzympaste durchgeführt.

2. Substanzen

An Substanzen wurden als Placebopaste eine normale Zahnpaste auf Phosphatbasis, als Enzympaste die in den vorstehenden Versuchen als theoretisch ausreichend wirksame, kombinierte Paste verwendet. Diese enthielt 1% Bakterien-Amylase, 0,5% Trypsin und war auf pH 6,8 gepuffert.

3. Methodik

Da in der Fachliteratur keinerlei Hinweise auf Untersuchungen der Belagsgewichte weicher Vorstufen des Zahnsteins zu finden sind, wurde der Versuch gemacht, eine Methode zur Feststellung dieser Gewichte auszuarbeiten. Die Untersuchungen wurden, wie erwähnt, in 3 Versuchsperioden durchgeführt.

Nach einer sehr gründlichen, systematischen Reinigung mit Hilfe einer elektrischen Zahnbürste (um vorhandene ältere Beläge ganz zu entfernen) durften die Probanden 24 Stunden lang ihre Zähne nicht putzen, vom Morgen des einen Tages bis zum Morgen des nächsten. In der 1. Versuchsperiode wurde am 2. Tag vor dem Frühstück eine kombinierte Putz- und Spülmethode angewendet:

Der Proband nahm jeweils eine kleine Menge destilliertes Wasser in den Mund und putzte nun systematisch in 3 verschiedenen Abschnitten der Zahnreihen getrennt mit der elektrischen Zahnbürste "Broxodent", die nach Literaturangaben einen optimalen Reinigungseffekt erzielt. Anschließend wurden die gesamten Zahnreihen noch einmal überputzt und nochmals ganz ausgespült. Die gesamte Dauer des Vorganges mußte mindestens 3 Minuten währen. Die ausgebürsteten und ausgespülten Beläge wurden aufgefangen.

Die Genauigkeit der Methode wird beeinträchtigt 1. durch Materialien aus der Mundhöhle, die durch das intensive Bürsten abgelöst werden, z.B. Epithelzellen, durch hämolytierte Erythrozyten aus kleinen Blutungen der Schleimhaut, die auftreten können, und durch Mikroorganismen in den Belägen; 2. durch eventuelle Restbeläge, die auch bei 3-minütigem, systematischem elektrischen Bürsten nicht erfaßt werden. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit einer hier liegenden größeren Fehlerquelle sehr gering, außerdem könnten die unter 1. und 2. angeführten Fehler sich gegenseitig kompensieren.

Um die Beläge auf Filter aufzubringen, wurde die Spülflüssigkeit zuerst über eine Saugflasche und eine Nutsche mittels einer Wasserstrahlpumpe durch eine 3-fache, sehr dichte Filterschicht (Blauband; 11 cm Durchmesser) gezogen. Hier blieb schon der größte Teil der Beläge zurück, das Filtrat wurde nochmals durch ein 4-fach gefaltetes Filter in einem Glastrichter einer Saugflasche gezogen. Der gesamte Filtersatz von je 4 Filtern wurde 1,5 Stunden bei 115 Grad C getrocknet, im Exsiccator zu einer Waage mit 1/10 mg Genauigkeit transportiert und möglichst schnell gewogen, da sich die Filtergewichte durch Aufnahme der Luftfeuchtigkeit sehr schnell ändern. Alle Filtersätze waren vor den Putzversuchen genauso behandelt und leer gewogen worden, die Differenzen wurden festgehalten. Zu den Versuchsperioden wurde eine Leerfilterreihe mit 10 Filtersätzen durchgeführt, um Fehler durch veränderte Filtergewichte auszuschalten.

In der 2. Versuchsperiode wurden vor dem Anwenden der Methode mit elektrischer Bürste und destilliertem Wasser die Zähne 3 Minuten mit einer normalen Bürste und normaler Zahnpaste geputzt. Mit der in der 1. Periode ausgeführten Methode sollten hier die durch einfaches Bürsten nicht erfaßten Reste von Belägen festgestellt werden.

In der 3. Periode wurde derselbe Versuch mit einer Enzypaste durchgeführt. (Nach den Ergebnissen der 2. Periode (Handelspaste) wurde die Paste 3 als ausreichend angesehen.)

Um dies zu begründen, muß auf die später dargestellten Resultate vorgegriffen werden.

Beim Putzen mit der Handelspaste hatte sich bei den In-vivo-Versuchen eine durchschnittliche Rest-Belagsdifferenz von 27,7 mg ergeben (mit einer Standardabweichung von 7.5 mg) (siehe Tab.9). Von diesem durchschnittlichen Belagsgewicht mußte noch die durchschnittliche Differenz beim Leerfilter-

Versuch abgezogen werden. Diese Leerfilterdifferenz konnte nicht für jeden einzelnen Probanden bestimmt und in Abzug gebracht werden, da jeder Filtersatz nach einmaliger Benutzung unbrauchbar war.

Da sowohl zu dem Durchschnittswert der Leerfilter als auch zu den Durchschnittswerten der Versuchsperioden Varianzen (s^2) gehören, müssen bei diesen Differenzbildungen die Gesetze der Fehlerfortpflanzung berücksichtigt werden. Das bedeutet in diesem Fall, daß sich die Varianzen addieren. Es ergibt sich eine Differenz der Durchschnittswerte von 21,2 mg mit einer Standard-Abweichung der Differenz von 9,4 mg.

Andererseits fanden sich bei der Paste Nr. 3 der In-vitro-Versuche ein durchschnittlicher Gewichtsverlust von 11035 mg, bei Umrechnung auf den Kohlehydratumsatz in 3 Min. ergeben sich 37 mg. (Analog bei Gelatine 7332 mg, umgerechnet auf Eiweiß-Umsatz in 3 Min. 39 mg).

Die Anteile von Kohlehydrat und Eiweiß in den gefundenen Belägen der Mundhöhle sind nicht bekannt. Auf Grund obiger Überlegungen hielten wir jedoch die Anwendung der Paste 3 als Enzympaste in den In-vivo-Versuchen für angebracht, sie würde auch dann ausreichend wirken, wenn die ganzen Beläge entweder aus Kohlehydrat oder aus Eiweiß bestünden.

Auch bei der 3. Periode wurden die Gewichte der Restbeläge festgestellt.

Bei den Versuchen der 2. und 3. Periode wurden die verschiedenen Pasten durch den Leiter der Versuche selbst aus äußerlich völlig gleichen Tuben appliziert, die Probanden wußten also nicht, mit welcher Paste sie gerade putzten.

Doppelte Blindversuche waren deswegen unmöglich, weil der Leiter der Versuche die Enzympaste bald an Farbe, Konsistenz und evtl. auch am Geruch erkennt.

4. Methodik der mathematisch-statistischen Sicherung

Bei den In-vivo-Versuchen wurde jede Versuchsperson in gleicher Reihenfolge der gleichen Prozedur unterworfen (Leerversuch - Handelspaste - Versuchspaste). Beim Vergleich z.B. zwischen Handels- und Versuchspaste lieferte jeder einzelne Proband sowohl ein Resultat (Mittelwert aus je 2 Differenzen zwischen Anfangs- und Endgewicht) bei dem einen als auch bei dem anderen Präparat. Es handelt sich daher bei diesen Ergebnissen um verbundene Stichproben. Diese prüften wir mittels des "Zeichen-Testes" (PFANZAGL, J. (1962)). Es wurden z.B. die Differenzen zwischen den Resultaten der Periode 2 und der Periode 3 gebildet.

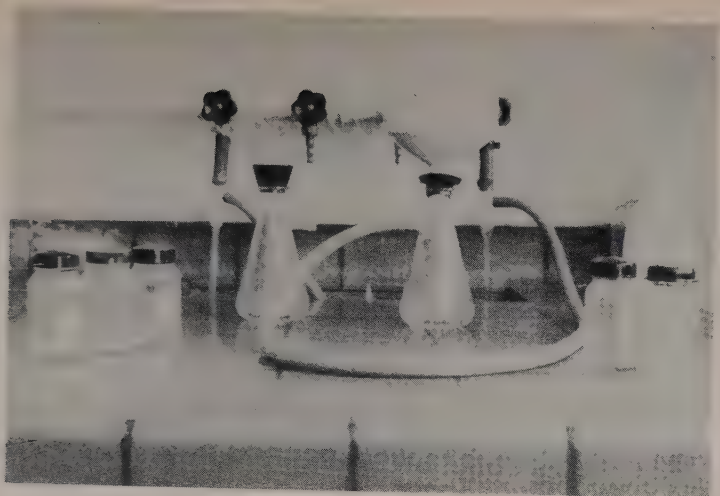


Abb. 10: Die Anordnung zum Filtern der Spülfüssigkeit

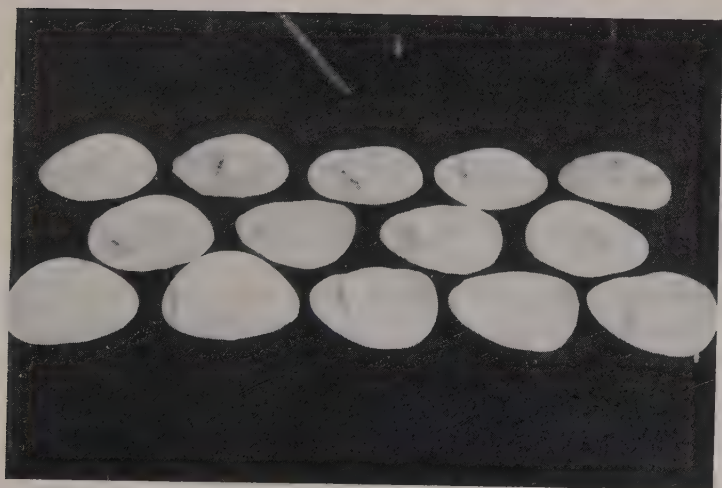
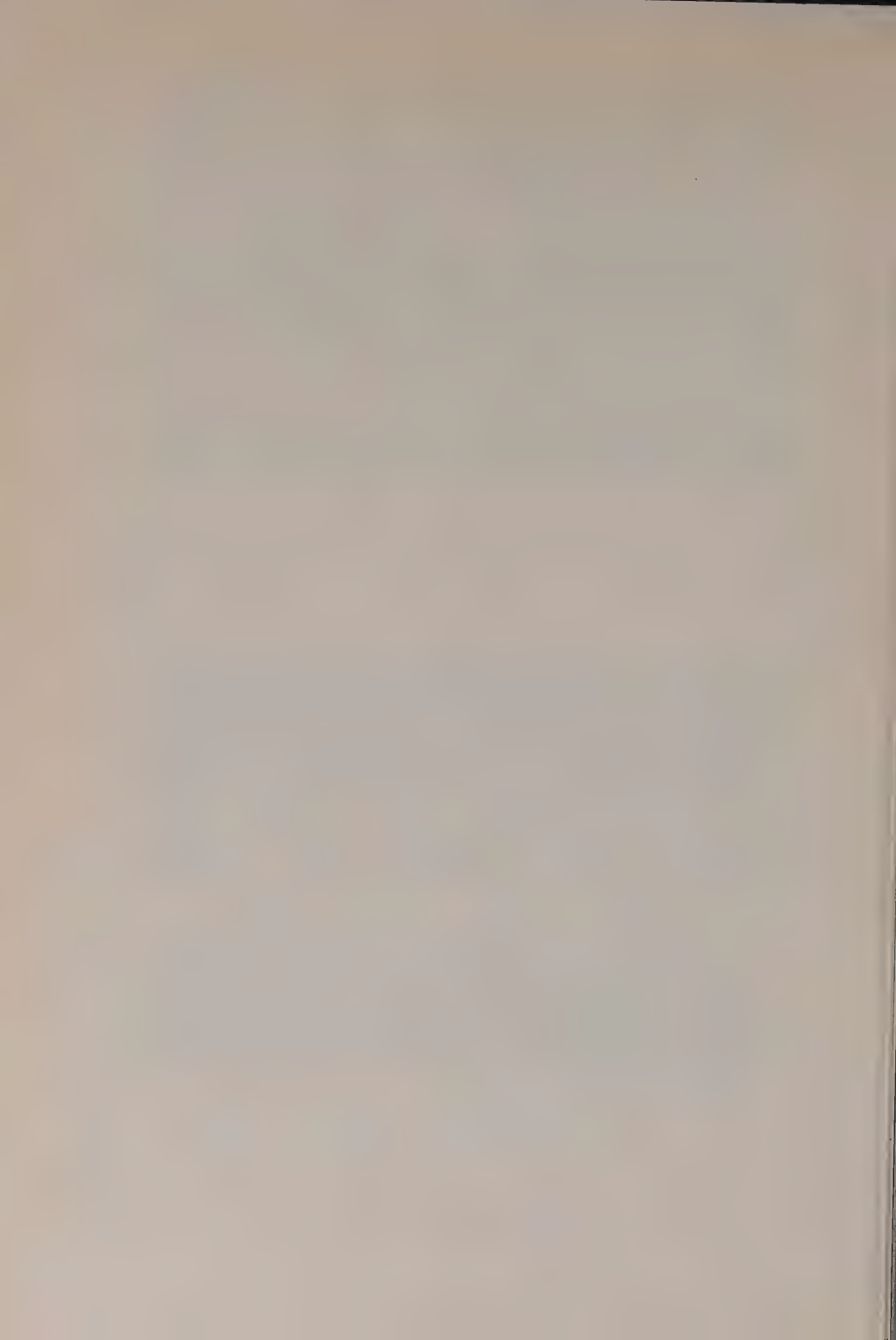


Abb. 11: Die Filtersätze nach dem Filtern und Trocknen



Beispiel:

Periode 2	Periode 3	(3) - (2)
36,50	26,05	- 10,45
34,65	7,25	- 27,40
35,60	12,30	- 23,30
24,35	11,20	- 13,15
35,50	12,15	- 23,25
23,55	16,10	- 7,45
15,40	11,85	- 3,55
19,55	6,80	- 12,75
23,60	12,05	- 11,55
28,20	5,50	- 22,70

Es treten bei Differenzbildung in der angegebenen Weise nur negative Vorzeichen auf. Falls kein Unterschied in der Wirkung von Handels- und Versuchspaste bestünde, ist zu erwarten, daß bei einer großen Zahl von Prüfungen positive und negative Vorzeichen in gleicher Zahl aufträten. Träfe diese Hypothese zu (positive und negative Vorzeichen gleich 1: 1), dann wäre die gefundene Abweichung der Vorzeichen von der Erwartung (nämlich z.B. hier kein positives Zeichen in einer Gruppe von 10 Vorzeichen bei einer Erwartung von 5 positiven und 5 negativen Zeichen) nur eine zufällige Schwankung des gewissermaßen "wahren" Verhältnisses von 1: 1 bzw. 50%: 50%. Mit Hilfe einer Tafel der kumulierten Binomialwahrscheinlichkeit wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Abweichungen vom Erwartungswert in der Größe der tatsächlichen und größer ermittelt. Beträgt der Wert dieser Wahrscheinlichkeit 1% und weniger, dann sehen wir das Ergebnis als signifikant an. 1% ist dann die Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. in 1% wird die Hypothese (50% positive und 50% negative Vorzeichen) verworfen, obwohl sie zutrifft. Im Beispiel beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Fehlen eines positiven Vorzeichens in einer Gruppe von 10 Vorzeichen bei Zutreffen der genannten Hypothese: 0,1%. Die Hypothese darf also verworfen werden; es darf also, mit anderen Worten, ein Unterschied zwischen den Behandlungsperioden (Handelspaste und Versuchspaste) angenommen werden. Tafeln nach: Harvard Univ. Press (1955)).

Bezüglich der Berechnung von Durchschnittswerten, Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte siehe S.21.

5. Ergebnisse

Zunächst werden die Meßwerte der einzelnen Versuchsperioden dargestellt, die statistischen Vergleiche zwischen den Perioden werden später durchgeführt. (Bei diesen Versuchen wurde eine etwas genauere Waage, bis 1/10 mg Genauigkeit, verwendet.)

Tabelle 5

Ergebnisse der 1. Versuchsperiode (je 2 Versuche pro Proband)

Die Filtergewichte vorher und nachher sind in g angegeben, die Differenzen in mg.

	Vorher	Nachher	Diff.	Vorher	Nachher	Diff.
A	3,0893	3,1255	36,2	3,0128	3,0658	53,0
B	3,1235	3,1583	34,8	2,9808	3,0246	43,8
C	2,9445	2,9793	34,8	2,9112	2,9716	60,4
D	3,0222	3,0814	59,2	2,9997	3,0525	52,6
E	3,0326	3,0691	36,5	3,0131	3,0712	58,1
F	3,0116	3,0564	44,8	3,0013	3,0466	45,3
G	2,9903	3,0198	29,5	2,9327	2,9762	43,5
H	3,0387	3,0952	56,5	2,9773	3,0256	48,3
I	3,0721	3,1142	42,1	2,9532	3,0009	47,7
K	3,0541	3,1134	59,3	2,9357	2,9938	58,1

Tabelle 6

Ergebnisse der 2. Versuchsperiode (mit Handelspaste)

(je 2 Versuche pro Proband)

Filterwerte in g, Differenzen in mg angegeben.

	Vorher	Nachher	Diff.	Vorher	Nachher	Diff.
A	3,0391	3,0638	24,7	3,0501	3,0774	27,3
B	3,1001	3,1182	8,1	3,0374	3,0438	6,4
C	3,0972	3,1121	14,9	3,0864	3,0961	9,7
D	3,0982	3,1075	9,3	3,0113	3,0244	13,1
E	2,9734	2,9842	10,8	3,1124	3,1259	13,5
F	2,9083	2,9205	12,2	2,9948	3,0148	20,0
G	3,0925	3,1030	10,5	3,1265	3,1397	13,2
H	3,0589	3,0653	6,4	3,0667	3,0739	7,2
I	2,9938	3,0032	9,4	2,9879	3,0026	14,7
K	3,0958	3,1022	6,4	3,0180	3,0226	4,6

Tabelle 7

Ergebnisse der 3. Versuchsperiode (mit Enzympaste)
(je 2 Versuche pro Proband)

Filterwerte in g, Differenzen in mg angegeben.

	Vorher	Nachher	Diff.	Vorher	Nachher	Diff.
A	3,0082	3,0468	38,6	2,9894	3,0238	34,4
B	3,1034	3,1373	33,9	3,0248	3,0602	35,4
C	2,9658	2,9984	32,6	3,0808	3,1194	38,6
D	2,9483	2,9772	28,9	3,1149	3,1347	19,8
E	3,0348	3,0693	34,5	2,9874	3,0239	36,5
F	2,9924	3,0259	33,5	3,0349	3,0486	13,6
G	3,0882	3,1084	20,2	3,0236	3,0342	10,6
H	3,0399	3,0676	27,7	3,0317	3,0431	11,4
I	3,0179	3,0492	31,3	3,1426	3,1585	15,9
K	2,9998	3,0276	27,8	3,0432	3,0718	28,6

Tabelle 8

Ergebnisse der Leerfilter-Versuche

Filterwerte in g, Differenzen in mg;

	Vorher	Nachher	Diff.	Vorher	Nachher	Diff.
1.	3,0356	3,0403	4,7	6. 3,0788	3,0852	6,4
2.	3,0219	3,0316	9,7	7. 3,0214	3,0263	4,9
3.	2,9918	2,9994	7,6	8. 3,0163	3,0226	6,3
4.	2,9101	2,9197	9,6	9. 2,9878	2,9930	5,2
5.	2,9618	2,9673	5,5	10. 2,9634	2,9682	4,8

Die nachstehend angeführten Differenzen sind die Durchschnittswerte aus je 2 Wiederholungen pro Versuchsperiode und Fall.

Tabelle 9

Differenzen zwischen den Filtergewichten vor und nach den Putzversuchen in den einzelnen Versuchsperioden und beim Leerfilter-Versuch (in mg).

	Periode 1	Periode 2	Periode 3	Leerfilter-Versuch	
Versuchs- person	ohne Vorputzen	nach Putzen mit Handels- paste	nach Putzen mit Enzympaste (1% Amylase u. 0, 5% Trypsin)	Filter Nr.	
A	44,6	36,5	26,0	1	4,7
B	39,3	34,7	7,3	2	9,7
C	47,6	35,6	12,3	3	7,6
D	55,9	24,4	11,2	4	9,6
E	47,3	35,5	12,2	5	5,5
F	45,1	23,6	16,1	6	6,4
G	36,5	15,4	11,9	7	4,9
H	52,4	19,6	6,8	8	6,3
I	44,9	23,6	12,1	9	5,2
K	58,7	28,2	5,5	10	4,8
Summe	472,3	277,1	121,4		64,7
$\bar{x}$	47,2	27,7	12,1		6,5
s^2	47,6	56,9	33,9		3,6
s	6,9	7,5	5,8		1,9
$s_{\bar{x}}$	2,2	2,4	1,8		0,6

Es folgen die mathematisch-statistischen Sicherungen der Ergebnisse der einzelnen Versuchsperioden gegeneinander.

Tabelle 10

Vergleich der Ergebnisse der 1. Versuchsperiode mit denen der 2. Versuchsperiode.

Periode 1	Periode 2	(2) - (1)
44,60	36,50	- 8,10
39,30	34,65	- 4,65
47,60	35,60	-12,00
55,90	24,35	-31,55
47,30	35,50	-11,80
45,05	23,55	-21,50
36,50	15,40	-21,10
52,40	19,55	-32,85
44,90	23,60	-21,30
58,70	28,20	-30,50

Da von 10 Vorzeichen keines positiv ist, beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 0,1\%$; der Unterschied der beiden Perioden ist somit gesichert.

Tabelle 11

Vergleich der Ergebnisse der 1. Periode mit denen der 3. Periode.

Periode 1	Periode 3	(3) - (1)
44,60	26,05	-18,55
39,30	7,25	-32,05
47,60	12,30	-35,30
55,90	11,20	-44,70
47,30	12,15	-35,15
45,05	16,10	-28,95
36,50	11,85	-24,65
52,40	6,80	-45,60
44,90	12,05	-32,85
58,70	5,50	-53,20

Da auch hier von 10 Vorzeichen keines positiv ist, ist P ebenfalls $0,1\%$; der Unterschied der Perioden ist auch hier gesichert.

Tabelle 12

Vergleich der Ergebnisse der 2. Periode mit denen der 3. Periode:

Periode 2	Periode 3	(3) - (2)
36,50	26,05	-10,45
34,65	7,25	-27,40
35,60	12,30	-23,30
24,35	11,20	-13,15
35,50	12,15	-23,35
23,55	16,10	- 7,45
15,40	11,85	- 3,55
19,55	6,80	-12,75
23,60	12,05	-11,55
28,20	5,50	-22,70

Auch hier ist von 10 Vorzeichen keines positiv, also $P = 0,1\%$; der Unterschied der Perioden ist hier ebenfalls gesichert.

Außer diesen Vergleichen zwischen den 3 Versuchsperioden war es erforderlich nachzuweisen, daß ein statistischer Unterschied besteht zwischen den teilweise sehr niedrigen Ergebnissen der 3. Versuchsperiode und den Ergebnissen der Leerfilterversuchsreihe. Da es sich hier wieder um unverbundene Stichproben handelt, mußte der Rang-Test nach Wilcoxon angewendet werden.

Tabelle 13

Vergleich der 3. Periode mit der Leerfilterreihe:

Periode 3		Leerfilterreihe	
Diff. in mg	Rang	Diff. in mg	Rang
5,5	5,5	4,7	1
6,8	9	4,8	2
7,25	10	4,9	3
11,2	14	5,2	4
11,85	15	5,5	5,5
12,05	16	6,3	7
12,15	17	6,4	8
12,3	18	7,6	11
16,1	19	9,6	12
26,0	20	9,7	13

$$S_1 = 143; E_{S_1} = 5(10 + 10 + 1) = 105; S_1 - E_{S_1} = 38;$$

Nachdem die Differenz auch hier über 34,0 (siehe S.17) liegt, kann man für diesen Vergleich ebenfalls feststellen, daß sich die Ergebnisse der Leerfilterreihe und der 3. Versuchsperiode deutlich voneinander unterscheiden.

Nebenwirkungen:

Außer einem leichten Brennen auf der Mundschleimhaut beim erstmaligen Putzen mit der Enzypaste bei einigen Probanden konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden.

Es folgen nach Seite 36 die graphische Darstellung der Differenzen pro Versuchsreihe und pro Fall und die Darstellung der Differenzen pro Proband und Versuchsperiode getrennt für die einzelnen Probanden.

Jede dargestellte Differenz ist der Durchschnittswert aus je 2 ermittelten Differenzen pro Fall und Versuchsperiode. (Wenn mehrere Werte auf den gleichen Platz fielen, wurden sie nebeneinander gezeichnet.)

D. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde im 1. Teil in experimentellen Versuchen die Aktivität besonders als Zahnsteininhibitoren ausgewählter Enzyme getestet und zwei in diesem Sinne besonders günstige Präparate, eine Amylase und ein Trypsin kombiniert in einer Zahnpaste verwendet.

Beim Vergleich zwischen einer Paste mit 0,5 und einer mit 1% Trypsin an je 10 Gelatine-Substratplatten konnten wir signifikante Unterschiede nachweisen. Das Gleiche gilt für den Vergleich zwischen einer Paste mit 0,5% Amylase und einer Paste mit 1% Amylase bei Prüfung an je 10 Stärke-Substratplatten. Daraus ist erkennbar, daß bereits ein solcher Konzentrationsunterschied in vitro zu einer nachweisbaren Wirkungsänderung führt.

Im 2. Teil wurden in klinischen Versuchen mit Hilfe einer speziell gearbeiteten kombinierten Putz-, Spül- und Wägemethode an 10 Probanden die normalen Gewichte weicher Beläge in der Mundhöhle, die Gewichte von Restbelägen nach normalem Putzen (mit Handelspaste) und nach Putzen mit Enzypaste festgestellt. Bei diesen In-vivo-Versuchen ergab sich, daß zwischen den Belagsdifferenzen in den einzelnen Versuchsperioden statistisch gesicherte Unterschiede vorhanden sind, und zwar wurden die Unterschiede zwischen folgenden Perioden geprüft:

Leerputzen (Periode 1) - Putzen mit Handelspaste (Periode 2) - Putzen mit Enzypaste (Periode 3).

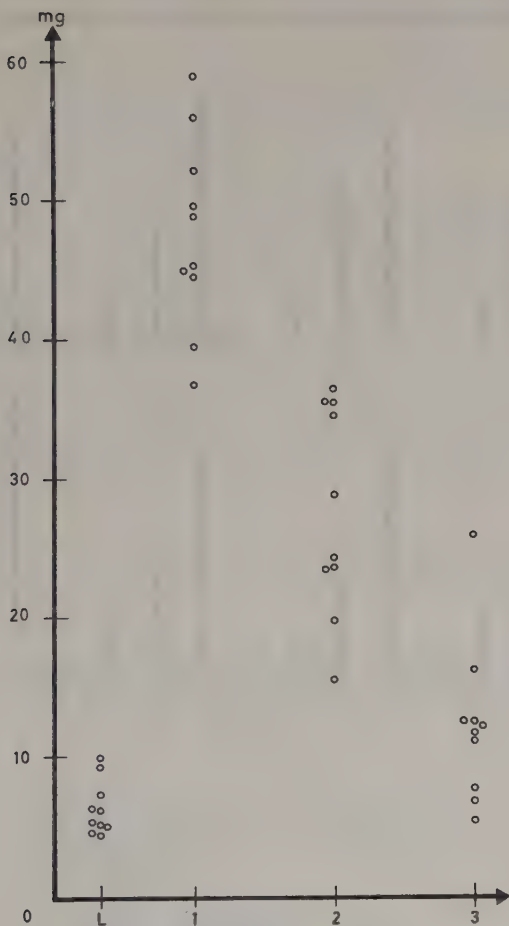
Aus dem statistisch gesicherten Unterschied zwischen den Leerfilterdifferenzen und den Differenzen der 3. Versuchsperiode schließen wir, daß die gefundenen Differenzen der 3. Versuchsperiode nicht durch Veränderungen der Filtergewichte wesentlich mitbedingt sind. Wodurch diese Differenzen in den Filtergewichten im Leerfilter-Versuch verursacht werden, ist unklar. Eine Störung der Versuchsergebnisse durch die stets gleiche Anordnung der Perioden ist zwar theoretisch möglich, aber praktisch nicht wahrscheinlich, da die Probanden vor den Versuchsperioden schon im Gebrauch der elektrischen Zahnbürste geübt waren; die meisten besaßen sogar schon längere Zeit eine eigene elektrische Zahnbürste. Wir haben allerdings die Möglichkeit nicht widerlegt, daß bei einer Änderung der Reihenfolge der Versuchsperioden andere Ergebnisse auftreten könnten.

Die durchschnittlichen Belagsdifferenzen der 3 Versuchsperioden verhalten sich zueinander etwa wie 4 : 2 : 1; (1. Periode zur 2. Periode zur 3. Periode). (Nach Abzug der in einem besonderen Versuch ermittelten durchschnittlichen Leerfilter-Differenzen ist dieses Verhältnis noch auffälliger (ca. 7 : 4 : 1)).

Die durchschnittlichen Belagsdifferenzen bei der Enzypaste waren am kleinsten, diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß man durch Putzen mit Enzypaste der angeführten Zusammensetzung von Amylase und Trypsin weiche Beläge in der Mundhöhle beseitigen und damit der Bildung fester Beläge vorbeugen kann.

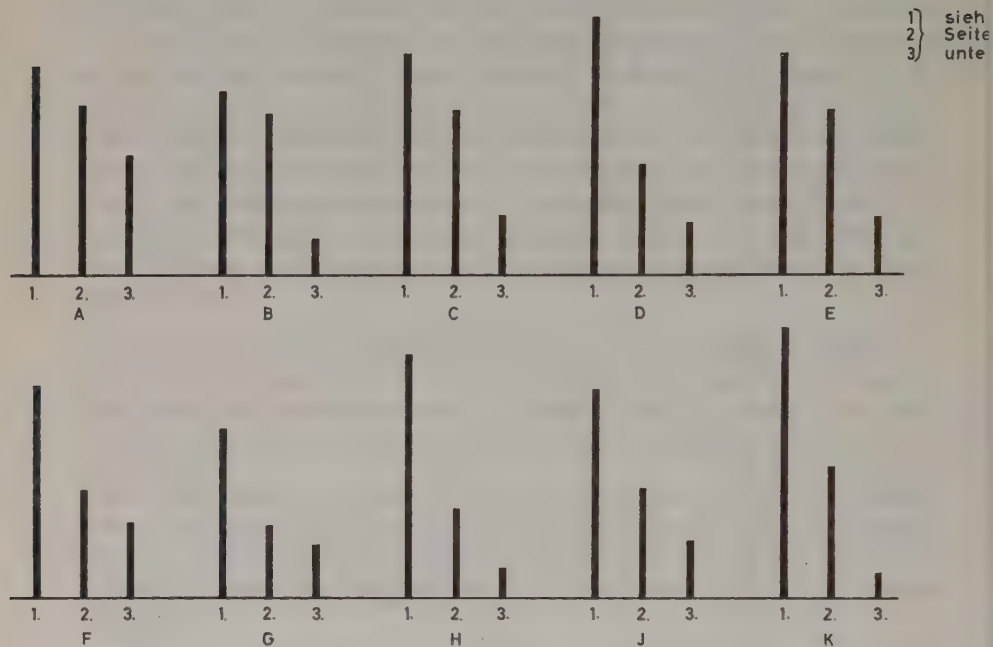
Eine weitere Steigerung des Erfolges wäre durch die Verwendung einer elektrischen Zahnbürste kombiniert mit einer wirksamen Enzypaste durchaus denkbar, kann aber mit der vorgenannten Meßmethode nicht mehr erfaßt werden.

Graphische Darstellung der Differenzen zwischen den Filtergewichten vor und nach den Putzversuchen in den einzelnen Versuchsperioden und beim Leerfilter - Versuch (in mg).



L = LEERFILTER - VERSUCHSREIHE
 1 = VERSUCHSPERIODE 1 (ohne Putzen)
 2 = VERSUCHSPERIODE 2 (Putzen mit Handelspaste)
 3 = VERSUCHSPERIODE 3 (Putzen mit Enzympaste)

Darstellung der Differenzen pro Proband und Versuchsperiode getrennt für die einzelnen Probanden



E. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem Überblick über neuere Untersuchungen von zahnsteinhemmenden Substanzen werden die Frühstadien der Zahnsteinbildung erläutert.

In einer experimentellen Versuchsreihe wurden verschiedene Amylasen, proteolytische Fermente und eine Lipase auf ihre lytische Wirkung zur Verwendung bei der Entfernung weicher Beläge der Zahnreihen im Sinne der Vorstufen für die Bildung von Zahnstein ausgetestet.

Bei diesen In-vitro-Versuchen ergaben sich bei verschiedenem Enzymgehalt von Pasten statistisch signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit auf Substratböden ($P \leq 1\%$). Nach diesen Ergebnissen wurde eine Enzympaste mit bestimmter Enzymkombination (1% Amylase und 0,5% Trypsin) für die folgenden klinischen Versuche ausgewählt.

In einer klinischen Versuchsreihe wurden mit Hilfe einer speziell ausgearbeiteten Putz-, Spül- und Wägemethode die Gesamtgewichte weicher Beläge in der Mundhöhle festgestellt (Periode 1), ebenfalls die Restbeläge nach normalem Putzen mit Handelpaste (Periode 2) und mit einer Enzympaste (Periode 3).

Auch bei den Ergebnissen der In-vivo-Versuche zeigten sich beim Vergleich der Belagsdifferenzen in den einzelnen Versuchsperioden signifikante Unterschiede ($P \leq 1\%$).

Die durchschnittlichen Belagsdifferenzen der 3 klinischen Versuchsperioden verhalten sich nach Abzug der besonders ermittelten Leerfilter-Differenzen etwa wie 7:4:1; (1. zur 2. zur 3. Periode).

Diese Ergebnisse sind ein Anhalt dafür, daß man bei Benutzung einer Enzympaste in der angegebenen Konzentration weiche Beläge der Mundhöhle in weitest möglichem Maße beseitigen kann, als dies bei Benutzung einer der üblichen Handelpasten der Fall ist.

Nebenwirkungen konnten nicht beobachtet werden.

F. LITERATURANGABEN

- ABDERHALDEN, R.: Vitamine, Hormone und Fermente. Basel 1946, S.191-196.
- ANDERSEN, B.: A Method to ascertain Proteolytic Activity. Am.J. Dis. Children 63, 891 (1943).
- ALEECE, A. A. and B. K. FORSCHER: Calculus Reduction with a Mucinas Dentifrice. J. Periodontol. 25, 122-125 (1952).
- BACK, R.: Ein Beitrag zur Wirkung des Sulforicinoleats auf Zahnstein. Zahnärztl. Rundsch. 47, 721-724 (1938).
- BAMANN, E. und K. MYRBÄCK: Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941, S.1169, S.1182, S.1882 ff, S.2060 f.
- DOSSENBACH, W. and H. R. MÜHLEMANN: Effect of Penicillin and Ricinoleate on Early Calculus Formation. Helv. Odont. Acta 5, 25-28 (1961).
- FLASCHENTRÄGER, B.: Physiologische Chemie. Berlin 1951, S.999-1010.
- GOTTLIEB, B. und B. ORBAN: Zahnfleischentzündung und Zahnlockerung. Berlin 1933, S.124 ff.
- GROSSMANN, L. I.: Effect of Chemical Agents on a Calculus Substitute. Oral Surg., Oral Med., Oral Path. 7, 484-487 (1954).
- HARVARD UNIV. PRESS: Tables of the Cumulative Binomial Probability Distribution. Cambridge, Mass. (1955).
- HAZEN, S. P. and H. A. ZANDER: Four-Week-Old Calculus. J. Dent. Res. 38, 710 (1959).
- HODGE, H. C. and S. W. LEUNG: Calculus Formation. J. Periodontol. 21, 211 (1950).
- HÖHLING, I. und E. und M. WANNEMACHER: Über den Zahnstein. Dtsch. Zahnärztebl. 16, 143-151 (1962).
- JENSEN, A. L.: Use of Dehydrated Pancrease in Oral Hygiene. J. Amer. Dent. Ass. 59, 923-930 (1959).
- KANTOROQICZ, A.: Klinische Zahnheilkunde. Berlin 1924, S.325 ff.
- KERR, D. A. and H. J. FIELD: Sodium-Hexamethaphosphate as an Aid in the Treatment of Periodontal Disease. J. Dent. Res. 23, 313-316 (1944).
- KING, R. M.: Clinical Study of the Effect of Tetradecylamine on Plaque Formations. J. Dent. Res. 30, 399-403 (1951).
- KOLLER, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, in: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Berlin 1955, S.972 f.
- KRAUS, F. W.: The Effect of Mouth Washes. Publ. Hlth. Dent. Dept. 529 (1958), zit. n. Schroeder, H. E. (1962).

- KUSCHINSKY, G.: Taschenbuch der modernen Arzneibehandlung. Stuttgart 1963, S. 275.
- LEHNARTZ, E.: Chemische Physiologie. Berlin 1959, S. 289-292.
- LEVY, B. M.: Development of Histo- and Cyto-Chemical Techniques for Oral Tissue Study. Techn. Naval. Sci. Apr. 215 (1957), zit. n. MÜHLEMANN, H. R. und U. SCHNEIDER (1959).
- LEUNG, S. W. and E. J. DRAUS: Effect of Certain Enzymes on Calculus Deposition. J. Dent. Res. 38, 709 (1959).
- MANDEL, I. D., B. M. LEVY and B. H. WASSERMANN: Histo-chemistry of calculus Formation. J. Periodont. 28, 132-137 (1957).
- MARTHALER, T. M., H. E. SCHROEDER and H. R. MÜHLEMANN: A Method for the Quantitative Assessment of Plaque and Calculus Formation. Helv. Odont. Acta 5, 39-42 (1961).
- MATHIS, H.: Die sogenannte Parodontose. Wien 1948, S. 385.
- MILLER, W. D.: Lehrbuch der konservierenden Zahnheilkunde. Leipzig 1896, S. 383 ff.
- MÜHLEMANN, H. R. and U. SCHNEIDER: Early Calculus Formation. Helv. Odont. Acta 3, 22-25 (1959).
- MÜLLER, E., H. E. SCHROEDER and H. R. MÜHLEMANN: The Effect of two Oral Antiseptics on Early Calculus Formation. Helv. Odont. Acta 6, 42-45 (1962).
- OPPIKOEFER, W.: Über Natrium-Ricinoleat und seine Bedeutung in der Zahnheilkunde. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 40, 11 (1930).
- PFANZAGL, J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik, Berlin 1962, S. 119 und 133 ff.
- ROSENTHAL, B.: Die Bekämpfung des Zahnsteins mit "Emsolith" im Lichte physikalisch-chemischer Anschauungen. Dtsch. Mschr. Zahnheilk. 43, 839-845 (1925).
- SACHS, H.: Beiträge zur Kenntnis von Bildung des Zahnsteins und seiner Verhütung. Dtsch. Mschr. Zahnheilk. 32, 113-124 (1914).
- SACHS, H.: Moderne Mundhygiene auf "biologischer" Grundlage. Zahnärztl. Rdsch. 33, 231-234 (1924).
- SCHNEIDER, U. und H. R. MÜHLEMANN: Frühstadien des Zahnsteins. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 69, 755-765 (1959).
- SCHROEDER, H. E. und T. M. MARTHALER: Normierte Folien als Zahnstein-träger. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 71, 596-603 (1961).
- SCHROEDER, H. E. and T. M. MARTHALER: A Study of Initial Calculus Formation Rate on Foils. Helv. Odont. Acta 6, 38-41 (1962)

- SCHROEDER, H. E.: Quantitative In-Vivo-Studie mit Zahnsteinhemmstoffen. Schweiz. Mschr. Zahnhlk. 72, 294-312 u. 399-412 (1962).
- SCHROEDER, H. E., T. M. MARTHALER and H. R. MÜHLEMANN: Effects of some Potential Inhibitors on Early Calculus Formation. Helv. Odont. Acta 6, 6-9 (1962).
- SCHROEDER, H. E. und H. R. MÜHLEMANN: Experimentelle quantitative In-Vivo Zahnsteinstudie. Dtsch. Zahn-, Mund- und Kieferhlk. 37, 284-302 (1962).
- SCHUPFER, K.: Über die zahnsteinlösende Wirkung des Sulforicinoleats. Wien. Med. Wschr. 4 (1934), zit. n. SCHROEDER, H. E. (1962).
- STEWART, G. G.: Mucinase, a Possible Means of Reducing Calculus Formation. J. Periodont. 23, 85-90 (1952).
- THOMAS, B. O. A.: The Limitation of a Calculus-Preventing Agent. J. Periodont. 27, 314-315 (1956).
- TÜRKHEIM, H.: Untersuchungen über das Zahnsteinlösungsvermögen der gebräuchlichen Zahnpasten. Zahnärztl. Rdsch. 33, 325 (1924).
- URBANTSCHITSCH, E. H.: Calculus dentalis supragingivalis. Dtsch. Zschr. Stomatol. 31, 235 (1934).
- WASSERMANN, B. H., I. D. MANDEL and B. M. LEVY: In Vitro Calcification of Dental Calculus. J. Periodontol. 29, 144-147 (1958).
- WILLI, W.: Untersuchungen über die Wirkung der Sulforicinoleate auf Zahnbeläge und Zahnstein. Schweiz. Mschr. Zahnhlk. 40, 241 (1930).
- WILLSTÄTTER, R.: Aktivitätsbestimmung von Amylasen, in: Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 126, 143 (1923).
- WILLSTÄTTER, R.: Aktivitätsbestimmung von Pankreas-Lipase, in: Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 125, 132 (1923).
- WILLSTÄTTER, R.: Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität, in: Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 161, 194 u. 206 (1926).
- WILLSTÄTTER, R.: Papain-Aktivitätsbestimmung, in: Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 138, 184 (1924).
- WOLF, T.: Über die zahnsteinlösende und zahnsteinerweichende Wirkung verschiedener Zahnpasten. Med. Diss. Bonn 1921.
- ZANDER, H. A.: The Attachment of Calculus to Root Surfaces. J. Periodont. 24, 16-19 (1955).
- ZANDER, H. A.: A Method for Studying "The Epithel Attachment". J. Dent. Res. 33, 308-312 (1956).

Herrn Professor Dr. Dr. P. Rieth e möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas sowie die allzeit gewährte Unterstützung herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Koller vom Institut für Med. Statistik und Dokumentation und seinen Mitarbeitern danke ich für die stets freundliche Hilfe bei der Auswertung des mathematisch-statistischen Teils.

LEBENS LAUF

Am 30. August 1939 wurde ich, Karl Walter Zilz, als Sohn des Zahnarztes Karl Zilz und seine Ehefrau Elisabeth, geb. Stutzinger, in Mannheim geboren. 1943 übersiedelte ich mit einem Eltern, durch Kriegseinwirkung gezwungen, nach Landstuhl in der Pfalz. Hier besuchte ich von 1945 bis 1950 die Volksschule, von 1950 bis 1956 das Staatliche Progymnasium Landstuhl und von 1956 bis 1959 das Staatliche Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Kaiserslautern. Dort legte ich im Februar 1959 mit Erfolg die Reifeprüfung ab und ließ mich im Sommersemester 1959 als Studierender der Zahnheilkunde an der Universität Mainz immatrikulieren. Im Sommersemester 1961 bestand ich hier das Physikum. Nach dem Wintersemester 1963/64 schloß ich mein Studium mit dem am 30. Juli 1964 vollständig bestandenen Staatsexamen ab. Am 21. August 1964 wurde mir vom Kultusministerium des Landes Rheinland-Pfalz die Bestallung als Zahnarzt erteilt.

